



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«ΚΑΤΑΝΟΜΗ GABA ΝΕΥΡΩΝΩΝ ΣΤΗ ΡΑΧΙΑΙΑ ΚΑΙ
ΚΟΙΛΙΑΚΗ ΜΟΙΡΑ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΥ»**

Σινάνη Όλγα

Τριμελής επιτροπή:

Α.Γερμενής, Καθηγήτριας Ανοσολογίας

Ε.Ασπροδίνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας (Επιβλέπουσα)

Α.Χατζηγεωργίου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας

ΛΑΡΙΣΑ 2013

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Εισαγωγή στον Ιππόκαμπο	4
1.2 Φυλογενετική εξέλιξη.....	6
1.3 Ανατομία του Ιπποκάμπου.....	6
1.3.1 Οδοντωτή έλικα	7
1.3.2 Κυρίως Ιππόκαμπος ή Αμμώνειο Κέρας.....	9
1.4 Διασυνδέσεις Ιπποκάμπου	14
1.4.1 Το τρισυναπτικό κύκλωμα.....	14
1.4.2 Προσαγωγές ίνες ιπποκάμπου	16
1.4.3 Απαγωγές ίνες ιπποκάμπου	16
1.5 Νευροδιαβιβαστές ιπποκάμπου.....	17
1.6 Υποδοχείς Ιπποκάμπου.....	17
1.6.1 L-γλουταμικό οξύ και υποδοχείς του	17
1.6.2 γ-Αμινοβουτυρικό οξύ και υποδοχείς του	21
1.7 Διαφορές ραχιαίου και κοιλιακού ιπποκάμπου-Υπόστρωμα για διαφορετικές λειτουργίες.....	26
1.7.1 Διαφοροποίηση στο επίπεδο των νευρωνικών κυκλωμάτων	27
1.7.2 Διαφοροποίηση σε βιοχημικό επίπεδο	28
1.7.3 Διαφοροποίηση σε ανατομικό επίπεδο	29
1.7.4 Διαφοροποίηση στην ισχαιμία.....	29
1.7.5 Ο ρόλος του ραχιαίου ιπποκάμπου στη χωρική μνήμη.....	30
1.7.6 Ο ρόλος του κροταφικού ιπποκάμπου	32
1.7.7 Κροταφικός ιππόκαμπος και επιληψία.....	33
1.8 Ιππόκαμπος και ισχαιμία.....	34
1.9 Κατανομή GABA νευρώνων στη ραχιαία και κοιλιακή μοίρα του ιπποκάμπου...37	
1.9.1 GABAεργικοί νευρώνες και ασβέστιο-δεσμευτικές πρωτεΐνες	39
1.9.2 GABAεργικοί νευρώνες και νευροπεπτίδια	41
1.9.3 GABAεργικοί νευρώνες και συνθάση του NO.....	43
1.10 Μονιμοποίηση και ο ρόλος της.....	44
1.11 Τρόποι μονιμοποίησης.....	45
1.11.1 Perfusion Fixation	45
1.11.2 Immersion Fixation	47
1.12 Μονιμοποιητικά διαλύματα	48
1.12.1 Φορμαλδεϋδη-Παραφορμαλδεϋδη.....	48
1.13 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	51

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
2.1 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	52
2.1.1 Πειραματόζωα.....	52
2.1.2 Παρασκευή ιστού.....	52
2.1.3 Επιλογή τομών για ανοσοφθορισμό.....	54
2.1.4 Μελέτες ανοσοφθορισμού.....	54
2.1.5 Μικροσκοπία και ανάλυση δεδομένων	55
2.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	57
2.2.1 Γενικά	57
2.2.2 Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός GABA νευρώνων.....	57
2.2.3 Προσδιορισμός έντασης φθορισμού του GABA στα κυτταρικά σώματα των ενδονευρώνων του ιπποκάμπου	61
2.2.4 Σύγκριση των δύο μονιμοποιητικών μεθόδων	62
2.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	64
2.3.1 Αποτίμηση μεθοδολογίας.....	65
2.3.2 Αριθμός GABA νευρώνων στη ραχιαία και κοιλιακή μοίρα του ιπποκάμπου	66
2.3.3 Ένταση φθορισμού GABA νευρώνων	67
2.3.4 Ποιότητα ιστού	68
2.4 ΠΕΡΙΛΗΨΗ	69
2.5 SUMMARY	70
2.6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	71

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Εισαγωγή στον Ιππόκαμπο

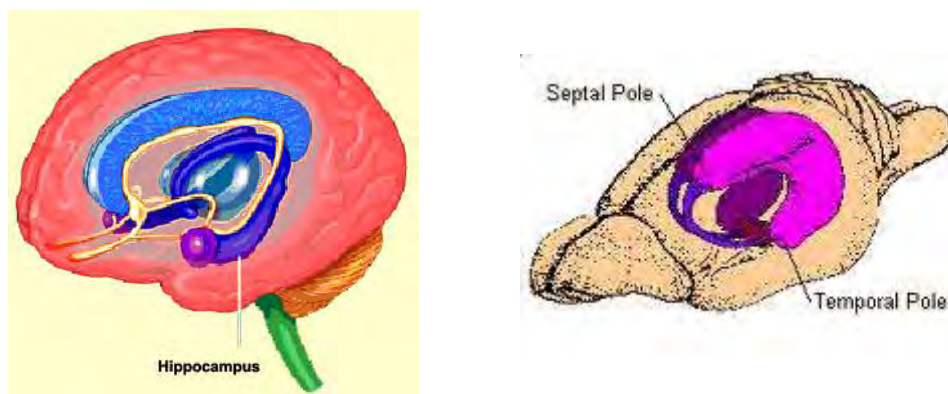
Ο ιππόκαμπος αποτελεί μία από τις πιο καλά μελετημένες δομές του κεντρικού νευρικού συστήματος. Πήρε την ονομασία του από τον ομώνυμο θαλάσσιο οργανισμό λόγω της ομοιότητας που παρουσιάζουν στο σχήμα, κατά τη διάρκεια του 16^{ου} αιώνα από τον ανατόμο Arantius (1587) (εικόνα 1).

Στον άνθρωπο αποτελεί μία εν τω βάθει δομή του κροταφικού λοβού σχήματος μισοφέγγαρου, συμμετρική ως προς τη μέση γραμμή και εκτεινόμενη από το οπίσθιο τμήμα της υπομεσολόβιας περιοχής μέχρι το κάτω κέρας της πλάγιας κοιλίας. Αδρά διακρίνεται σε πρόσθιο και οπίσθιο ιππόκαμπο. Το πρόσθιο τμήμα είναι σαφώς μεγαλύτερο από το οπίσθιο (εικόνα 2).

Στον επίμυ ο ιππόκαμπος έχει επίσης σχήμα C με τα δύο άκρα του παρόμοια σε μέγεθος και εκτείνεται από τους πυρήνες του διαφράγματος προσθιο-ραχιαία, πάνω και πίσω από το διεγκέφαλο προς τον κροταφικό λοβό οπισθο-κοιλιακά (Johnston and Amaral 1998). Διακρίνεται σε ραχιαίο ή διαφραγματικό ιππόκαμπο και σε κοιλιακό ή κροταφικό ιππόκαμπο (εικόνα 2). Ο ραχιαίος (διαφραγματικός) πόλος του ιπποκάμπου στον επίμυ αντιστοιχεί στο οπίσθιο τμήμα του ιπποκάμπου στον άνθρωπο και ο κοιλιακός (κροταφικός) πόλος του ιπποκάμπου στον επίμυ στο πρόσθιο τμήμα του ιπποκάμπου στον άνθρωπο.



Εικόνα 1: Ανθρώπινος ιππόκαμπος (αριστερά) και θαλάσσιος ιππόκαμπος (δεξιά) (Courtesy of Professor Laszlo Seress, University of Pecs).



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση της μορφής και της θέσης του ιπποκάμπου ανθρώπινου εγκεφάλου (αριστερά) και εγκεφάλου αρουραίου (δεξιά) (<http://thebrain.mcgill.ca/flash> και <http://hargreaves.swong.webfactional.com>).

Οι πρώτες ανατομικές μελέτες του ιπποκάμπου πραγματοποιήθηκαν στις αρχές του προηγούμενου αιώνα από τους Ramon y Cajal και Lorente de No (Ramon y Cajal, 1911; Lorente de No, 1933, 1934) οι οποίοι με τη χρήση της τεχνικής του Golgi ενέδειξαν ένα μεγάλο μέρος της ανατομικής οργάνωσης του ιπποκάμπου. Το σύνολο των κυττάρων και των νευρικών ινών ενός στρώματος θεωρήθηκε ότι αποτελεί μία λειτουργική μονάδα του ιπποκάμπου. Η αρχική θεωρία ήταν πως ο ιπποκάμπος αποτελείται από τις λειτουργικές μονάδες του σε παράλληλη διάταξη κάθετα στον επιμήκη άξονά του (Andersen et al., 1971).

Δύο χαρακτηριστικά του ιπποκάμπου κέντρισαν το ενδιαφέρον των ερευνητών και έδωσαν μεγάλη ώθηση στη μελέτη του:

Το πρώτο χαρακτηριστικό αφορά στον σημαντικό ρόλο του ιπποκάμπου στη βραχυπρόθεσμη μνήμη και τη μάθηση. Η περίπτωση του ασθενούς H.M. τη δεκαετία του 1950, ο οποίος λόγω της φαρμακοανθεκτικής επιληψίας του υποβλήθηκε σε συμμετρική χειρουργική εξαίρεση των ιπποκάμπων του, αποτέλεσε ορόσημο στην διερεύνηση του ρόλου του ιπποκάμπου στις διαδικασίες μνήμης και μάθησης. Μετά την χειρουργική επέμβαση, ο H.M. θεραπεύθηκε από τις επιληπτικές κρίσεις αλλά αδυνατούσε πλέον να μετατρέψει καινούριες πληροφορίες σε μακροχρόνια μνήμη. Τα ευρήματα αυτά αναπαράχθησαν έπειτα και σε άλλους ασθενείς και φάνηκε πως ο ιπποκάμπος αποτελεί μια κρίσιμη δομή για τις λειτουργίες της μνήμης και της μάθησης.

Το δεύτερο ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του ιπποκάμπου είναι το χαμηλότερο κατώφλι εμφάνισης επιληπτικών κρίσεων σε σχέση με κάθε άλλη εγκεφαλική περιοχή (Green et al., 1964; Greco et al., 1994). Οι περισσότεροι επιληπτικοί

ασθενείς παρουσιάζουν κρίσεις που περιλαμβάνουν τον ιππόκαμπο και αποτελούν συχνά τις πιο δύσκολες περιπτώσεις ιατρικής αντιμετώπισης. Ακόμη, ο ιππόκαμπος είναι ιδιαίτερα ευπαθής στην ανοξία και φαίνεται να εμπλέκεται στην παθολογία ασθενειών όπως η Alzheimer και η σχιζοφρένεια (Jonston and Amaral, 1998).

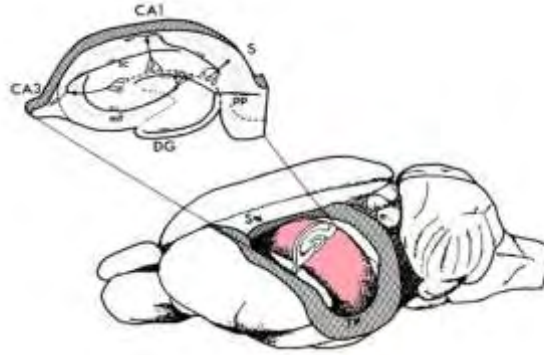
1.2 Φυλογενετική εξέλιξη

Ο ιππόκαμπος είναι μια από τις πολυπλοκότερες και φυλογενετικά αρχαιότερες δομές του εγκεφάλου. Μια από τις πρώτες περιοχές του τοιχώματος του πρόσθιου εγκεφάλου των πρωτόγονων σπονδυλωτών διαφοροποιείται σχηματίζοντας τον αρχαιοφλοιό. Καθώς ο πρόσθιος εγκέφαλος επεκτείνεται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, ο ιππόκαμπος (αρχαιοφλοιός) πιέζεται και προβάλλεται προς το εσωτερικό του εγκεφάλου και εφάπτεται με τον κροταφικό λοβό. Έτσι, καθώς αυτός ο λοβός επιμηκύνεται, ο ιππόκαμπος σύρεται σχηματίζοντας μια καμπυλωτή δομή από το ραχιαίο πρόσθιο εγκέφαλο προς τον κροταφικό λοβό και τελικά καταλήγει εξ' ολοκλήρου μέσα στο λοβό αυτό, στριμωγμένος απέναντι από την αμυγδαλή. Ο ιππόκαμπος διατηρεί την πρωτόγονη σύνδεσή του με το διάφραγμα μέσω μιας παχιάς ταινίας, που ονομάζεται ψαλίδα (fornix), της οποίας το σχήμα περιγράφει την τροχιά της ανάπτυξης του ιπποκάμπου (The Hippocampus Book, Oxford University Press, 2007; 115-131).

1.3 Ανατομία του ιπποκάμπου

Ο όρος ιπποκάμπος σχηματισμός περιλαμβάνει έξι διακριτές περιοχές: την οδοντωτή έλικα (dentate gyrus), τον κυρίως ιππόκαμπο ή Κέρας του Άμμωνα (Cornu Ammonis) ο οποίος υποδιαιρείται σε 3 πεδία (CA1, CA2 και CA3), το υπόθεμα (subiculum), το προϋπόθεμα (presubiculum), το παραϋπόθεμα (parasubiculum) και τον ενδορινικό φλοιό (entorhinal cortex) (The Hippocampus Book, Oxford University Press, 2007; 37-114).

Η εσωτερική δομή του ιπποκάμπου παραμένει η ίδια καθ'όλο το μήκος του. Σε κάθετη διατομή προς τον επιμήκη άξονά του (ραχιαίος – κοιλιακός), η εσωτερική δομή του ιπποκάμπου σχηματισμού αποτελείται από δύο «C», το ένα ανάστροφα σε σχέση με το άλλο. Το ένα αποτελεί το Αμμώνειο κέρα (Cornu Ammonis) και το άλλο την οδοντωτή έλικα (Dentate Gyrus).



Εικόνα 3: Γραμμικό σχέδιο εγκεφάλου αρουραίου που δείχνει τον επιμήκη (ραχιαίο-κοιλιακό) και τον κάθετο άξονα του υποκάμπειου σχηματισμού (Amaral and Witter, 1989).

1.3.1 Οδοντωτή Έλκα

Κυτταροαρχιτεκτονική οργάνωση

Η οδοντωτή έλκα έχει χαρακτηριστικό σχήμα V ή U ανάλογα με το διαφραγματοκοιλιακό επίπεδο και αποτελείται από τρεις στιβάδες :

- τη μοριώδη στιβάδα (molecular layer, ML): βρίσκεται πλησιέστερα προς την υποκαμπική σχισμή και πρόκειται για μία σχετικώς ακυτταρική στιβάδα που περιέχει κυρίως τους δενδρίτες των κοκκοειδών κυττάρων, των καλαθοειδών κυττάρων και διαφόρων πολυμορφικών κυττάρων καθώς και τα αξονικά δίκτυα από τον ενδορινικό φλοιό
- την κοκκιώδη στιβάδα (granular cell layer, GL): αποτελείται από τα κοκκοειδή κύτταρα, πυκνά διατεταγμένα σε στήλες
- την πολύμορφη στιβάδα ή πύλη της οδοντωτής έλικας (Hilus , H): περιέχει ποικιλία νευρικών κυττάρων με πιο κοινά τα βρυώδη κύτταρα (mossy cells)

Νευρώνες οδοντωτής έλικας

A) Διεγερτικοί νευρώνες

Οι κύριοι νευρώνες της οδοντωτής έλικας είναι τα κοκκοειδή κύτταρα.. Το σχήμα των κοκκοειδών κυττάρων είναι ελλειψοειδές με πλάτος περίπου 10μm και ύψος 18μm. Οι δενδρίτες αυτών των κυττάρων έχουν σχήμα κωνοειδές και εξαπλώνονται στο επιφανειακό τμήμα της μοριώδους στιβάδας. Οι άξονές τους σχηματίζουν τις βρυώδεις ίνες, οι οποίες εκτείνονται αρχικά στη στιβάδα των πολύμορφων κυττάρων της οδοντωτής έλικας και στη συνέχεια κατευθύνονται προς

τη CA3 περιοχή του υποκάμπτου όπου και σχηματίζουν συνάψεις με τα πυραμιδικά κύτταρα της περιοχής.

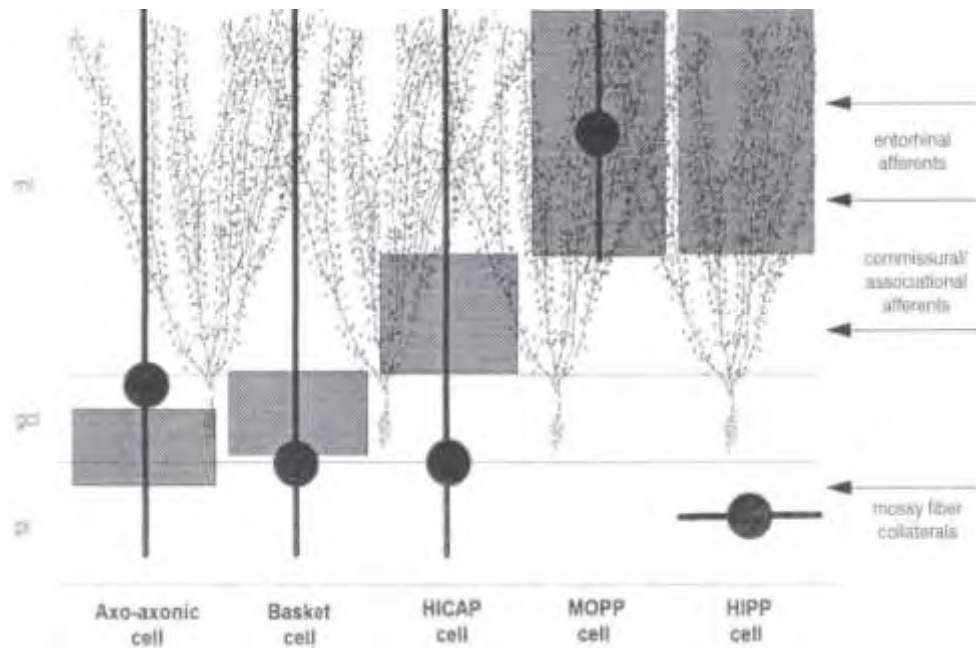
Η πυκνότητα των κοκκοειδών κυττάρων και το πάχος της κοκκώδους στιβάδας ποικίλει ανάλογα με το διαφραγματο-κροταφικό επίπεδο. Συγκεκριμένα, η πυκνότητα των κυττάρων είναι μεγαλύτερη διαφραγματικά παρά κροταφικά. Επειδή η πυκνότητα των πυραμιδικών κυττάρων της CA3 περιοχής ακολουθεί αντίστροφη κλίση, αυτό έχει σαν αποτέλεσμα στο διαφραγματικό επίπεδο του υποκάμπτου η αναλογία κοκκοειδών κυττάρων προς τα πυραμιδικά κύτταρα της CA3 περιοχής να είναι 12:1 ενώ στο κροταφικό επίπεδο 2:3.

Τα βρυώδη κύτταρα (mossy cells) της πολύμορφης στιβάδας αποτελούν τη δεύτερη πιο σημαντική κατηγορία διεγερτικών νευρώνων της οδοντωτής έλικας. Τα κύτταρα αυτά εμφανίζουν ανοσοδραστικότητα στο γλουταμικό οξύ και οι άξονες τους νευρώνουν το εσωτερικό 1/3 της κοκκώδους στιβάδας του σύστοιχου καθώς και του ετερόπλευρου ημισφαιρίου (The Hippocampus Book, Oxford University Press, 2007; 37-114).

B) Ανασταλτικοί νευρώνες της οδοντωτής έλικας

Η οδοντωτή έλικα περιλαμβάνει σημαντικό αριθμό ανασταλτικών GABAεργικών ενδονευρώνων που βρίσκονται κυρίως στη μοριώδη στιβάδα και στην εσωτερική πλευρά της κοκκώδους στιβάδας. Οι σημαντικότεροι τύποι είναι οι εξής:

- τα καλαθοειδή κύτταρα (basket cells): βρίσκονται μεταξύ της κοκκοειδούς και της πολυμορφικής στιβάδας και ο άξονάς τους σχηματίζει ένα δίκτυο γύρω από τα σώματα των κοκκοειδών κυττάρων
- τα άξονο-αξονικά κύτταρα (axo-axonic cells): βρίσκονται στα όρια κοκκώδους και μοριώδους στιβάδας και συνάπτονται στη ζώνη έκφυσης των αξόνων των κοκκοειδών κυττάρων
- τα HICAP cells (hilar comisural-associated pathway related cells): εντοπίζονται στο όριο μεταξύ της κοκκώδους και της πολύμορφης στιβάδας
- τα MOPP cells (molecular layer perforant path associated cells): εντοπίζονται στην μοριώδη στιβάδα
- τα HIPPC cells (hilar perforant path associated cells): εντοπίζονται στην πολύμορφη στιβάδα



Εικόνα 4: Μορφολογική ταξινόμηση των ενδονευρώνων της οδοντωτής έλικας του αρουραίου. Οι μαύροι κύκλοι υποδηλώνουν τη θέση των κυτταρικών σωμάτων και οι μαύρες γραμμές τον προσανατολισμό και την κατανομή των δενδριτών τους (Freund and Buzaki, 1996)

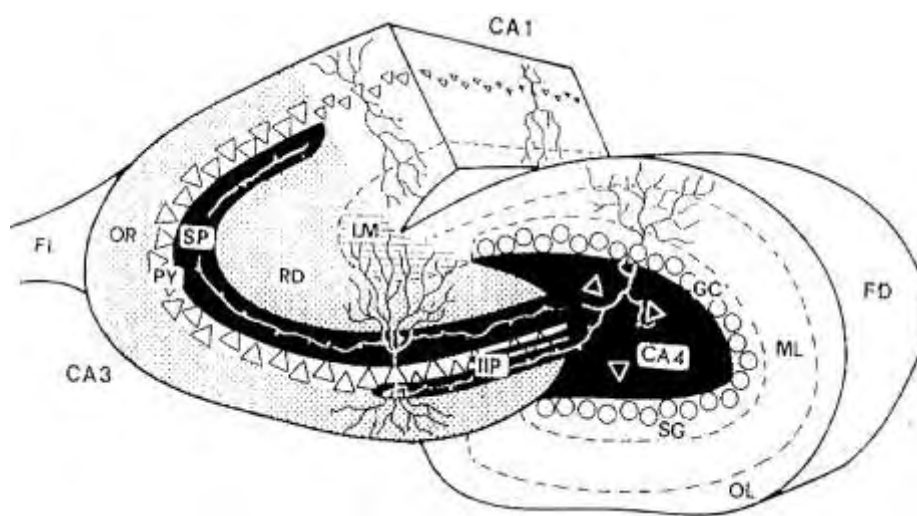
1.3.2 Κυρίως Ιππόκαμπος ή Αμμόνιο Κέρας

Κυτταροαρχιτεκτονική οργάνωση

Ο κυρίως ιππόκαμπος ή Αμμόνιο Κέρας διαιρείται σε 3 διακριτές περιοχές που ονομάζονται CA3, CA2, CA1, με τη σειρά από την οδοντωτή έλικα προς το υπόθεμα. Ο διαχωρισμός αυτός έγινε από τον Lorente de No (Lorente de No, 1934) και χρησιμοποιείται ευρέως έως και σήμερα. Στο Αμμόνιο κέρας διακρίνονται (με κατεύθυνση από την επιφάνεια προς τα μέσα) οι εξής στιβάδες, οι οποίες υφίστανται καθ'όλο το μήκος του ιπποκάμπου:

- η σκάφη (alveus): πρόκειται για μία λεπτή στιβάδα η οποία αποτελείται από εξερχόμενες αλλά και εισερχόμενες αξονικές ίνες οι οποίες σχηματίζουν αρχικά την παρυφή και στη συνέχεια την ψαλίδα
- η στιβάδα των πολύμορφων κυττάρων (stratum oriens): πρόκειται για μία σχετικώς ακυτταρική στιβάδα η οποία περιλαμβάνει τους βασικούς δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων καθώς και ποικιλία ενδονευρώνων
- η πυραμιδική στιβάδα (stratum pyramidale): περιλαμβάνει τα κυτταρικά σώματα των πυραμιδικών νευρώνων που αποτελούν τους κυρίως νευρώνες του Αμμόνιου κέρατος

- η διαφανής στιβάδα (stratum lucidum): βρίσκεται ακριβώς κάτω από την πυραμιδική στιβάδα και μόνο στη CA3 περιοχή και καταλαμβάνεται από τις βρυώδεις ίνες
- η ακτινωτή στιβάδα (stratum radiatum): βρίσκεται κάτω από τη διαφανή στιβάδα στη CA3 περιοχή και κάτω από την πυραμιδική στιβάδα στη CA2 και CA1 περιοχή. Αποτελείται από τους κορυφαίους και εγγύς δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων καθώς επίσης και από πλήθος ενδονευρώνων
- η βοθριώδης-μοριώδης στιβάδα (stratum lacunosum-moleculare): αποτελείται από τους άνω δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων καθώς και από ενδονευρώνες



Εικόνα 5: Διάγραμμα του ιπποκάμπου. Διακρίνονται οι στιβάδες του κυρίως ιπποκάμπου καθώς και της οδοντωτής έλικας. OR: stratum oriens: στιβάδα πολύμορφων κυττάρων, SP: stratum pyramidale: πυραμιδική στιβάδα, RD: stratum radiatum: ακτινωτή στιβάδα, LM: stratum lacunosum-moleculare: βοθριώδης-μοριώδης στιβάδα, ML: molecular layer: μοριώδης στιβάδα, GC: granular cell layer: στιβάδα κοκοειδών κυττάρων (Berberich et al., 2007)

Νευρώνες Αμμόνιου Κέρατος

Α) Διεγερτικοί νευρώνες

Ο κύριος νευρώνας του Αμμόνιου κέρατος είναι το πυραμιδικό κύτταρο, το οποίο ονομάζεται έτσι λόγω του σχήματος του σώματός του. Το πυραμιδικό κύτταρο έχει ένα βασικό δενδριτικό δένδρο που εκτείνεται στην στιβάδα των πολύμορφων κυττάρων (stratum oriens) και ένα κορυφαίο δενδριτικό δένδρο που εκτείνεται μέχρι την ιπποκάμπεια σχισμή. Παρουσιάζει διαφορετικό μέγεθος στις τρεις περιοχές καθώς και διαφορετικές διασυνδέσεις. Οι πυραμιδικοί νευρώνες της CA3 περιοχής έχουν μεγάλα σώματα και δέχονται νεύρωση από τις βρυώδεις ίνες των κοκκοειδών

κυττάρων της οδοντωτής έλικας, ενώ οι πυραμιδικοί νευρώνες της CA1 περιοχής έχουν μικρότερα σώματα και δε δέχονται συνάψεις από τις βρυώδεις ίνες. Τέλος, οι πυραμιδικοί νευρώνες της CA2 περιοχής έχουν μεγάλου μεγέθους κυτταρικά σώματα, ανάλογα με αυτά της CA3 περιοχής, αλλά, όπως οι νευρώνες της CA1 περιοχής, δεν δέχονται συνάψεις από βρυώδεις ίνες.

B) Ανασταλτικοί νευρώνες

Εκτός από τους πυραμιδικούς ή κύριους νευρώνες (principal neurons), που αποτελούν και το μεγαλύτερο μέρος των νευρώνων του ιπποκάμπου, υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός ενδονευρώνων ή διάμεσων νευρώνων (non principal neurons), που εξαπλώνονται σε όλες τις στιβάδες του ιπποκάμπου και είναι στη συντριπτική τους πλειοψηφία GABAεργικοί (Svoboda et al, 1999). Ο Ribak και οι συνεργάτες του το 1978, ήταν οι πρώτοι που απέδειξαν ότι στους ενδονευρώνες υπάρχει το ένζυμο αποκαρβοξυλάση του γλουταμικού οξέος (GAD) που εμπλέκεται στη σύνθεση του GABA (Ribak et al., 1978). Οι GABAεργικοί ενδονευρώνες παρόλο που αποτελούν μόλις το 10% των νευρώνων του ιπποκάμπου, αντιπροσωπεύουν την επιτομή της κυτταρικής ετερογένειας στο ΚΝΣ. Συνάπτονται τόσο με πυραμιδικούς νευρώνες, όσο και με άλλους ενδονευρώνες (Somogyi and Klausberger, 2005). Εμφανίζουν τεράστια ποικιλία όσον αφορά στη μορφολογία, στη συνδεσμολογία και ακόμη περισσότερο στους νευροχημικούς δείκτες τους (Freund and Buzaki, 1996). Παρά την τεράστια ανάγκη θέσπισης αποτελεσματικών κριτηρίων ταξινόμησής τους ώστε να υπάρχει κοινή γλώσσα επικοινωνίας ανάμεσα στους νευροεπιστήμονες, οι ενδονευρώνες ακόμη και σήμερα φέρνουν στο νου μνήμες από τη Βαβέλ. Αρκετές προσεγγίσεις είναι πλέον διαθέσιμες για να ξεπεραστούν οι προκλήσεις και τα προβλήματα των διαφόρων συστημάτων ταξινόμησης. Έτσι πλέον, σήμερα η ταξινόμηση των ενδονευρώνων γίνεται με βάση α) τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά, β) τους νευροχημικούς τους δείκτες, γ) τις ηλεκτροφυσιολογικές τους ιδιότητες, δ) τη φύση της συναπτικής διεγερτικής μεταβίβασης (Macaferri et al., 2003). Ωστόσο, τα πλέον χρησιμοποιούμενα συστήματα ταξινόμησης είναι τα πρώτα δύο.

Με βάση την εντόπιση και τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά οι ενδονευρώνες διακρίνονται στις εξής υποκατηγορίες (εικόνα 6):

➤ καλαθοφόρα κύτταρα (basket cells): τα σώματα των κυττάρων αυτών βρίσκονται στην πυραμιδική στιβάδα ή στο όριο αυτής με την πολυμορφική, οι

δενδρίτες τους εκτείνονται στην πολυμορφική, την ακτινωτή και την βοθριώδη-μοριώδη στιβάδα, ενώ οι άξονές τους διακλαδίζονται και σχηματίζουν καλάθια γύρω από τα σώματα των πυραμιδικών κυττάρων

➤ αξο-αξονικά κύτταρα ή chandelier cells: τα σώματα και οι δενδρίτες αυτών των κυττάρων εντοπίζονται σε παρόμοιες θέσεις με τα καλαθιοφόρα κύτταρα αλλά οι άξονές τους εκτείνονται μόνο σε μια λεπτή ζώνη στο όριο πυραμιδικής και πολυμορφικής στιβάδας και συνάπτονται στον εκφυτικό κώνο των πυραμιδικών κυττάρων

➤ διστιβαδωτά κύτταρα (bistratified cells): τα σώματα των κυττάρων αυτών εντοπίζονται κοντά στην πυραμιδική στιβάδα, ενώ οι δενδρίτες και οι άξονές τους εντοπίζονται στην ακτινωτή και την πολυμορφική στιβάδα. Τα κύτταρα αυτά συνάπτονται τόσο σε κορυφαίους όσο και σε βασικούς δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων

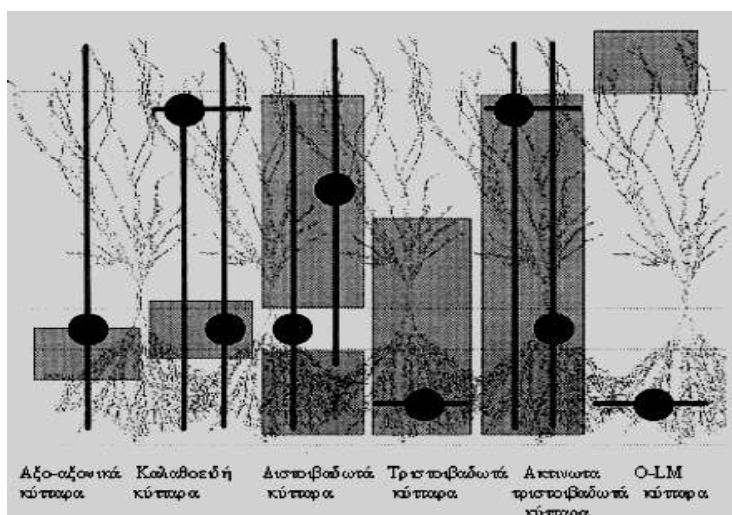
➤ O-LM κύτταρα (lacunosum-molecular cells): τα σώματα και οι δενδρίτες των κυττάρων αυτών εντοπίζονται στην πολυμορφική στιβάδα και οι άξονές τους στην μοριώδη-βοθριώδη στιβάδα. Συνάπτονται στους άπω δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων

➤ τριστιβαδωτά κύτταρα (trilaminar cells): ονομάζονται οι νευρώνες των οποίων οι άξονες, ανεξάρτητα από τη θέση του κυτταρικού σώματος, εντοπίζονται σε τουλάχιστον τρεις στιβάδες

➤ κύτταρα της ακτινωτής στιβάδας (stratum radiatum cells): αφορά τους νευρώνες των οποίων τόσο το σώμα, όσο οι δενδρίτες και οι άξονες εντοπίζονται στην ακτινωτή στιβάδα

➤ κύτταρα της μοριώδους-βοθριώδους στιβάδας (stratum lacunosum-molecular cells): ο άξονας αυτών των νευρώνων εντοπίζεται στη βοθριώδη-μοριώδη στιβάδα ή και στην ακτινωτή και συνάπτονται με τους άπω δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων

➤ IS νευρώνες (interneuron specific cells): οι νευρώνες αυτής της κατηγορίας εντοπίζονται σε όλες τις στιβάδες και το βασικό χαρακτηριστικό τους είναι ότι συνάπτονται μόνο με άλλους ενδονευρώνες και ποτέ με πυραμιδικούς νευρώνες



Εικόνα 6: Μορφολογική ταξινόμηση των ενδονευρώνων του αμμόνιου κέρατος του αρουραίου. Οι μαύροι κύκλοι υποδηλώνουν τη θέση των κυτταρικών σωμάτων και οι μαύρες γραμμές τον προσανατολισμό και την κατανομή των δενδριτών τους (Freund and Buzaki, 1996).

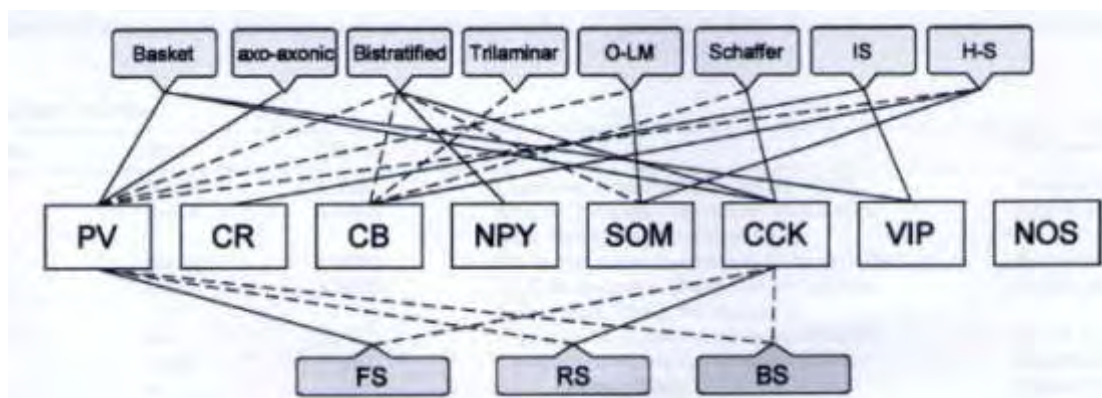
Οι κύριοι υποπληθυσμοί των GABAεργικών ενδονευρώνων στον ιππόκαμπο μπορούν να διακριθούν επίσης με βάση την ασβέστιο-δεσμευτική πρωτεΐνη, τα νευροπεπίδια, τα ένζυμα ή τους υποδοχείς που εκφράζουν (The Hippocampus Book, Oxford University Press, 2007, 176-181). Οι κύριοι νευροχημικοί δείκτες που χρησιμοποιούνται για την ταξινόμησή τους φαίνονται στον πίνακα 1.

Ασβέστιο-δεσμευτικές πρωτεΐνες	Νευροπεπίδια	Ένζυμα	Υποδοχείς νευροδιαβιβαστών
Παρθαλβουμίνη (PR)	Σωματοστατίνη (SOM)	Συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (NOS)	Υποδοχείς γλουταμικού
Καλβιδίνη D28k (calbindin D28k)	Νευροπεπτίδιο Y (neuropeptide Y)		Υποδοχείς GABA
Καλρετινίνη (CR)	Χολοκυστοκίνη (CCK)		Υποδοχείς μονοαμινών
	Αγγειοδραστικό εντερικό πολυπεπτίδιο (VIP)		Υποδοχείς ακετυλοχολίνης
	Εγκεφαλίνη		Υποδοχείς οπιοειδών
	Νευροκίνη		Υποδοχείς της ουσίας P

Πίνακας 1: Νευροχημικοί δείκτες συχνά χρησιμοποιούμενοι για την ταξινόμηση των ενδονευρώνων του ιπποκάμπου (Freund and Buzaki, 1996).

Παρόλο που οι ενδονευρώνες του ιπποκάμπου διακρίνονται με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά ή τους νευροχημικούς δείκτες που τους

χαρακτηρίζουν, σημαντική προσπάθεια γίνεται ώστε η ταξινόμηση να βασίζεται σε συνδυασμό των δύο αυτών κριτηρίων. Έτσι τα καλαθοφόρα κύτταρα μπορούν να διακριθούν σε τουλάχιστον δύο τύπους: σε αυτά που φέρουν την ασβέστιο-δεσμευτική πρωτεΐνη παρβαλβουμίνη (PV) και αυτά που φέρουν το νευροπεπτίδιο χολοκυστοκινίνη (CCK) και/ή το αγγειοδραστικό εντερικό πεπτίδιο (VIP) (Freud et al, 2003). Τα άξο-άξονικά κύτταρα φέρουν επίσης την ασβέστιο-δεσμευτική πρωτεΐνη παρβαλβουμίνη (PV), στα διστιβαδωτά κύτταρα φαίνεται να εκφράζεται τόσο παρβαλβουμίνη (PV), όσο σωματοστατίνη (SOM) και αγγειοδραστικό εντερικό νευροπεπτίδιο (VIP), στα O-LM κύτταρα παρβαλβουμίνη (PV) και σωματοστατίνη (SOM) και στα IS κύτταρα καλρετινίνη (CR) και αγγειοδραστικό εντερικό νευροπεπτίδιο (VIP) (εικόνα 7) (Somogyi and Klausberger, 2005).



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση της ποικιλομορφίας των ανατομικών και ηλεκτροφυσιολογικών χαρακτηριστικών των GABAεργικών κυττάρων, ταξινομημένων με βάση των νευροχημικό δείκτη που φέρουν. BS: burst spiking cell, FS: fast spiking cell, RS: regular spiking cell (Jinno et al., 2006).

1.4 Διασυνδέσεις ιπποκάμπου

1.4.1 Το τρισυναπτικό κύκλωμα

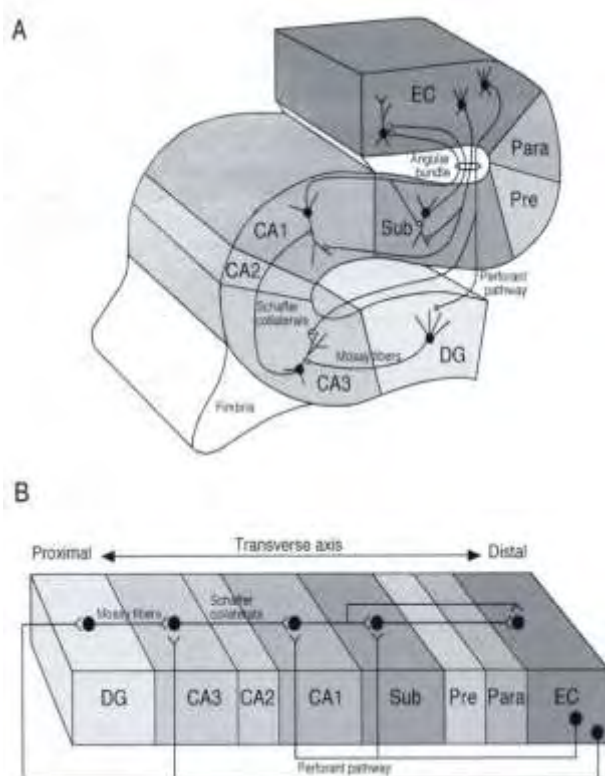
Το «τρिसυναπτικό κύκλωμα» αποτελεί το βασικό κύκλωμα λειτουργίας του ιπποκάμπου, μέσω του οποίου πραγματοποιείται η κύρια ροή πληροφοριών στον ιππόκαμπο. Το τρισυναπτικό κύκλωμα επαναλαμβάνεται σε όλο τον επιμήκη άξονα του ιπποκάμπου.

Νευρώνες της στιβάδας II του ενδορινικού φλοιού (EC) προβάλλουν μονόδρομα στα κοκκοειδή κύτταρα της οδοντωτής ελίκας (DG) μέσω της

διατιτραίνουσας οδού (perforant pathway). Στη συνέχεια από τα κοκκοειδή κύτταρα της οδοντωτής έλικας ξεκινούν οι βρυώδεις ίνες (mossy fibers) που καταλήγουν στους κορυφαίους δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων της CA3 περιοχής. Παρόλο που κάποιοι παράπλευροι κλάδοι των αξόνων των πυραμιδικών κυττάρων της CA3 περιοχής επιστρέφουν στην οδοντωτή έλικα, δεν νευρώνουν κοκκοειδή κύτταρα οπότε το κύκλωμα παραμένει μονόδρομο (Shepherd et al, 1998). Στη συνέχεια, τα πυραμιδικά κύτταρα της CA3 περιοχής μέσω των παράπλευρων ινών του Schaffer (Schaffer collaterals) προβάλλουν στα πυραμιδικά κύτταρα της CA1 περιοχής. Τα τελευταία, μέσω του υποθέματος, προβάλλουν πίσω στον ενδορινικό φλοιό στη στιβάδα V ή VI.

Ενδορινικός φλοιός → Οδοντωτή έλικα (σύναψη 1), Οδοντωτή έλικα → CA3 (σύναψη 2), CA3 → CA1 (σύναψη 3) (εικόνα 8 Α).

Όλες οι παραπάνω συνδέσεις είναι διεγερτικές (Amaral and Witter, 1995). Πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι νευρώνες από τη στιβάδα II του ενδορινικού φλοιού προβάλλουν μέσω της διατιτραίνουσας οδού απευθείας στη CA3 περιοχή του ιπποκάμπου. Επιπλέον, από τη στιβάδα III του ενδορινικού φλοιού εκφύονται άξονες που νευρώνουν απευθείας την CA1 περιοχή και την περιοχή του υποθέματος μέσω της διατιτραίνουσας οδού (perforant pathway) και της σκάφης (alvear pathway), αντίστοιχα (Deller et al., 1996) (εικόνα 8B).



Εικόνα 8: Α) Το βασικό τρισυναπτικό κύκλωμα του ιπποκάμπου Β) Προβολές κατά μήκος του εγκάρσιου άξονα του ιπποκάμπειου σχηματισμού (The Hippocampus Book, Oxford University Press, 2007; 38-39).

1.4.2 Προσαγωγές ίνες του ιπποκάμπου

Η κύρια είσοδος των πληροφοριών στον ιππόκαμπο γίνεται μέσω των ινών που προέρχονται από τον ενδορινικό φλοιό (perforant pathway). Ο ενδορινικός φλοιός με τη σειρά του δέχεται δεμάτια ινών από διάφορες περιοχές του εγκεφαλικού φλοιού όπως από τα πρωτογενή οσφρητικά κέντρα (προαπιοειδής χώρα), από το μετωπιαίο φλοιό, την αμυγδαλή, το θάλαμο και από διάφορες περιοχές του νεοφλοιού. Ίνες που εκφύονται από την έλικα του προσαγωγίου φθάνουν επίσης στον ενδορινικό φλοιό μέσω του προσαγωγίου.

Εκτός από τον ενδορινικό φλοιό και την διατιτραίνουσα οδό, πηγή εισόδου πληροφοριών στον ιππόκαμπο αποτελεί και η ψαλίδα. Η ψαλίδα είναι ένα συμπαγές δεμάτιο που συνδέει τον ιππόκαμπο με τον υποθάλαμο και άλλα μορφώματα του εγκεφάλου. Οι ίνες της σχηματίζουν αρχικά τη σκάφη του ιπποκάμπου, τη λευκή λεπτή στιβάδα της κοιλιακής επιφάνειας του Αμμωνείου κέρατος και στη συνέχεια συγκλίνουν κατά μήκος της έσω επιφάνειας του ιπποκάμπου για να σχηματίσουν την παρυφή του ιπποκάμπου. Η ψαλίδα περιέχει προσαγωγές ίνες από τους πυρήνες του διαφράγματος, αλλά πάνω από όλα προσαγωγές ίνες από την ενδορινική χώρα του ετερόπλευρου ημισφαιρίου μέσω του συνδέσμου της ψαλίδας (Nieuwenhuys et al., 1997). Βλάβη της ψαλίδας οδηγεί σε εξασθένιση των διαδικασιών της μνήμης και της μάθησης, η οποία προσομοιάζει με αυτή που προκύπτει μετά από βλάβη του ίδιου του ιπποκάμπου (Kandel et al., 1999).

1.4.3 Απαγωγές ίνες του ιπποκάμπου

Εκτός από τις λίγες ίνες που φεύγουν από τον ιππόκαμπο μέσω των επιμήκων χορδών, η ψαλίδα περιέχει όλες τις άλλες απαγωγές οδούς. Η ψαλίδα διαιρείται σε μία προσυνδεδεστική μοίρα και σε μία μετασυνδεδεστική μοίρα. Οι ίνες της προσυνδεδεστικής ψαλίδας απολήγουν και συνάπτονται στο διάφραγμα, την προοπτική περιοχή και τον υποθάλαμο. Οι ίνες της μετασυνδεδεστικής ψαλίδας απολήγουν και συνάπτονται στο μαστίο (κυρίως στον έσω πυρήνα του μαστίου), στον πρόσθιο πυρήνα του θαλάμου και στον υποθάλαμο. Μερικές ίνες της ψαλίδας εκτείνονται μέχρι την φαιά ουσία γύρω από τον υδραγωγό του μέσου εγκεφάλου (Nieuwenhuys et al., 1997; Εγχειρίδιο περιγραφικής ανατομικής, Π. Χ. Πασχαλίδης, 2009; 234-235).

1.5 Νευροδιαβιβαστές του ιπποκάμπου

Μεγάλος αριθμός νευροδιαβιβαστών και νευροτροποποιητών έχουν μελετηθεί στο ιππόκαμπο (πίνακας 2). Τα επίπεδα αυτών έχει βρεθεί ότι είναι διαφορετικά ανάμεσα στο διαφραγματικό και κροταφικό τμήμα του ιπποκάμπου (Hortnagl et al., 1991).

Γλουταμικό οξύ	Εγκεφαλίνη	Δυνορφίνη
Ασπαρτικό	GABA	Αγγειοτενσίνη
Ακετυλοχολίνη	Νορεπινεφρίνη	Σεροτονίνη
Αδενosίνη	Ισταμίνη	Ντοπαμίνη
Σωματοστατίνη	Χολοκυστοκινίνη	Ουσία P
Γαλανίνη	Νευροπεπτίδιο Y	
Αγγειοδραστικό εντερικό νευροπεπτίδιο (VIP)		
Παράγοντας απελευθέρωσης κορτικοτροπίνης (CRF)		

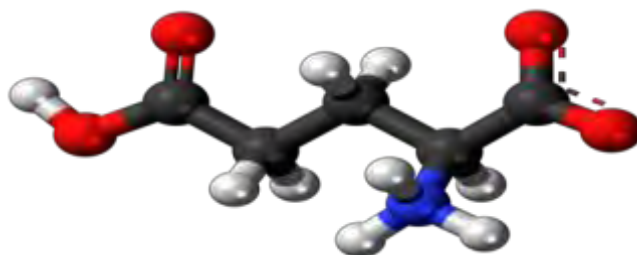
Πίνακας 2: Νευροδιαβιβαστές και νευροτροποποιητές του ιπποκάμπου (Nicolle et al, 1988).

1.6 Υποδοχείς του ιπποκάμπου

Στον ιππόκαμπο απαντάται μεγάλος αριθμός υποδοχέων, οι οποίοι ποικίλουν μεταξύ τους τόσο αριθμητικά όσο και ποιοτικά. Οι κυριότερες κατηγορίες υποδοχέων που απαντώνται στον ιππόκαμπο είναι: α) οι υποδοχείς του γλουταμικού οξέος και β) οι υποδοχείς του γ-αμινοβουτυρικού οξέος.

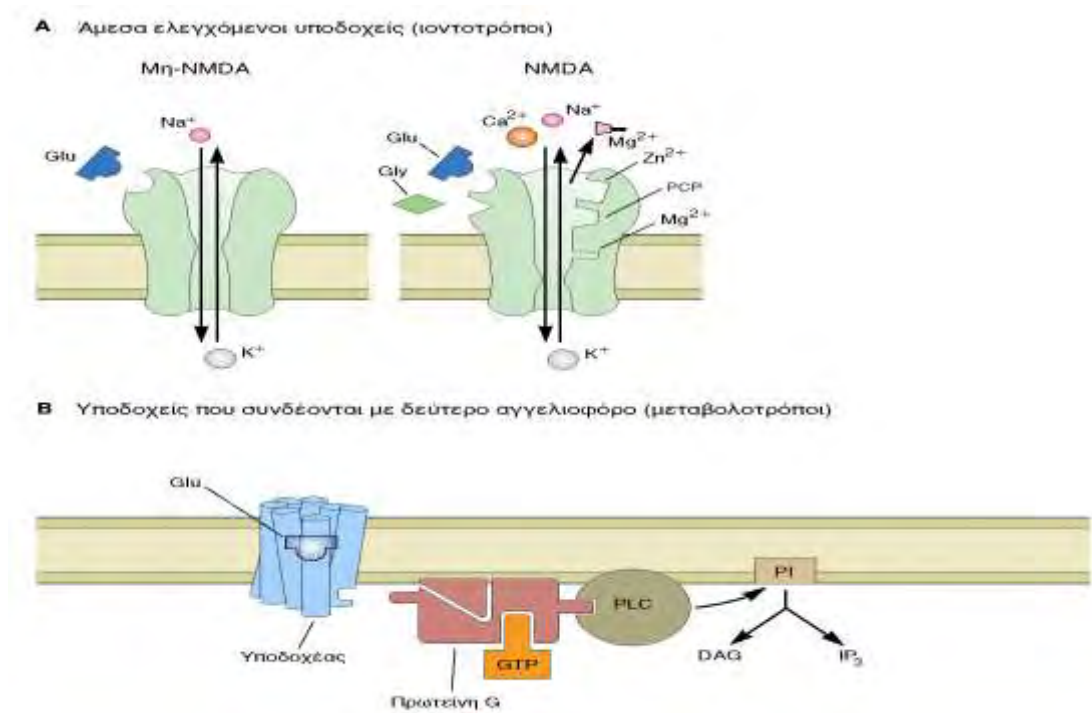
1.6.1 L-γλουταμικό οξύ και υποδοχείς του

Το L-γλουταμικό είναι ο κύριος διεγερτικός νευροδιαβιβαστής στο κεντρικό νευρικό σύστημα, ενώ παράλληλα αποτελεί τον κύριο νευροδιαβιβαστή των διασυνδέσεων του ιπποκάμπου (εικόνα 9). Συντίθεται από το α-κετογλουταρικό, το οποίο παράγεται στον κύκλο του Krebs, με τη βοήθεια ενός ενζύμου, της αμινοτρανσφεράσης του α-κετογλουταρικού.



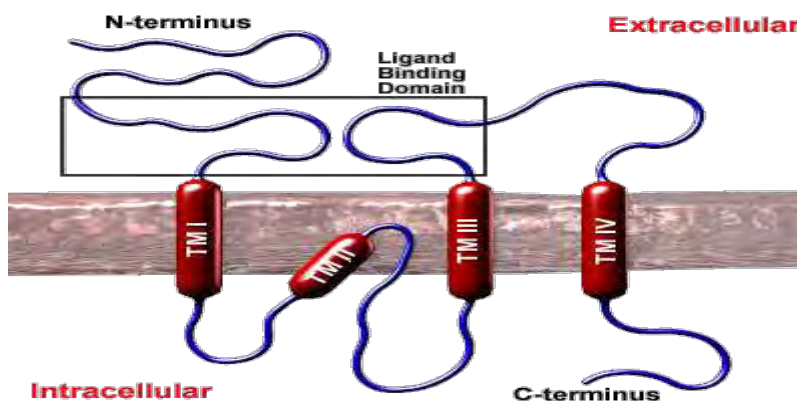
Εικόνα 9: L-γλουταμικό οξύ (http://en.wikipedia.org/wiki/Glutamic_acid).

Υπάρχουν δύο μεγάλες κατηγορίες υποδοχέων γλουταμικού: οι μεταβοτροπικοί και οι ιοντοτροπικοί (εικόνα10). Έχουν αναγνωριστεί 7 είδη μεταβοτρόπων υποδοχέων του γλουταμικού (mGluR1-mGluR7), ενώ οι ιοντοτρόποι διακρίνονται στους: α) υποδοχείς AMPA (α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate) (GluR1-GluR4), β) υποδοχείς kainate (GluR5-GluR7) και γ) υποδοχείς NMDA (N-methyl-D-aspartate) (Petralia et al., 1994). Οι ιοντοτρόποι υποδοχείς με τη σύνδεση του νευροδιαβιβαστή, που έχει απελευθερωθεί από το προσυναπτικό κύτταρο, επιτρέπουν τη μεταφορά φορτισμένων ιόντων διαμέσου διαύλου που σχηματίζεται από το σύμπλεγμα του υποδοχέα. Η ροή αυτή των ιόντων προκαλεί την εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης και τη δημιουργία δυναμικού ενέργειας που μεταδίδεται στο μετασυναπτικό κύτταρο.



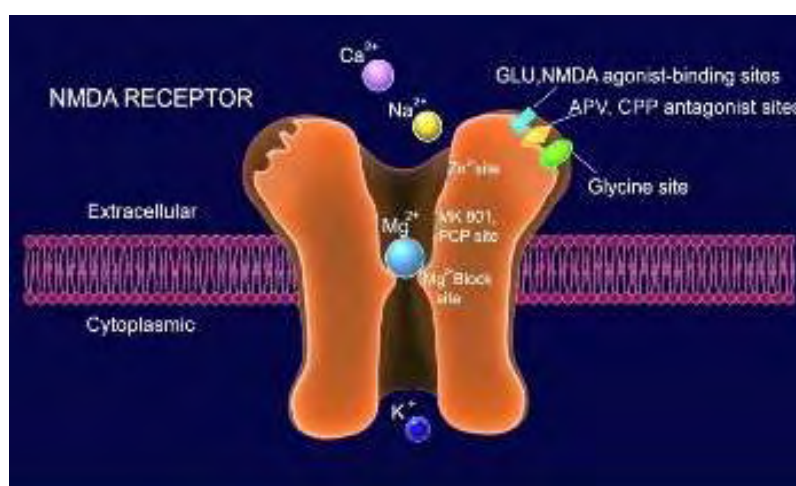
Εικόνα 10: Οι υποδοχείς του L-γλουταμικού οξέος (<http://physiology.med.uoa.gr/documents>).

Όλες οι υπομονάδες των ιοντοτρόπων υποδοχέων του γλουταμικού έχουν παρόμοια δομή (εικόνα 11). Κάθε υπομονάδα αποτελείται από τέσσερις υδρόφοβες διαμεμβρανικές περιοχές (TM I-IV). Η περιοχή TM II σχηματίζει μία αγκύλη στη μεμβράνη, έχοντας ως αποτέλεσμα εξωκυττάριο αμινοτελικό και ενδοκυττάριο καρβοξυτελικό άκρο. Η μακριά αγκύλη ανάμεσα στη διαμεμβρανική περιοχή III και IV σχηματίζει μαζί με τμήμα του αμινοτελικού άκρου την περιοχή όπου προσδένεται το γλουταμικό (<http://www.bristol.ac.uk/synaptic/receptors/>).



Εικόνα 11: Γενική δομή υπομονάδας ιονοτροπικού γλουταμικού υποδοχέα (<http://www.bristol.ac.uk/synaptic/receptors>).

Οι NMDA υποδοχείς είναι πολυμερή συμπλέγματα τεσσάρων πρωτεϊνικών υπομονάδων, δύο NR1 και δύο NR2 υπομονάδων. Η έκφραση και των τεσσάρων υπομονάδων είναι απαραίτητη για τη δημιουργία λειτουργικών διαύλων (εικόνα 12).



Εικόνα 12: Ο NMDA υποδοχέας (<http://www.nimh.nih.gov/health/educational-resources/neuroscience-and-psychiatry>).

Για την ενεργοποίηση των NMDA υποδοχέων απαραίτητη είναι εκτός από τη σύνδεση του γλουταμικού και η σύνδεση της γλυκίνης. Η γλυκίνη δρα ως συναγωνιστής του γλουταμικού και η θέση σύνδεσής της βρίσκεται στην NR1 υπομονάδα. Η θέση όπου προσδένεται το γλουταμικό βρίσκεται στο σημείο όπου ενώνονται η NR1 και NR2 υπομονάδες.

Οι NMDA υποδοχείς διαμεσολαβούν μία αργή συνιστώσα της συναπτικής διαβίβασης, η οποία εμπλέκεται στην διαδικασία της συναπτικής πλαστικότητας (Kandel et al., 1999). Χαρακτηριστικό των υποδοχέων αυτών είναι ότι ελέγχονται

από νευροδιαβιβαστές αλλά είναι ταυτόχρονα και τασεοεξαρτώμενοι. Συγκεκριμένα στο δυναμικό ηρεμίας οι υποδοχείς NMDA είναι αδρανείς. Αυτό οφείλεται στο ότι ο διάυλος των NMDA υποδοχέων φράσσεται από ένα ιόν Mg^{2+} , η παρουσία του οποίου στο κέντρο του διαύλου είναι τασεοεξαρτώμενη. Το Mg^{2+} απομακρύνεται μετά την εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης με ηλεκτροστατική ώθηση. Η αρχική εκπόλωση της μεμβράνης του κυττάρου προκαλείται από τους AMPA υποδοχείς του γλουταμικού (<http://www.bristol.ac.uk/synaptic/receptors>).

Η διέγερση των NMDA υποδοχέων προκαλεί αυξημένη εισροή ιόντων ασβεστίου στο κύτταρο. Η αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυττάριου ασβεστίου μετασυναπτικά προκαλεί την μετατόπιση της PKC από το κυτταρόπλασμα στην κυτταρική μεμβράνη, τη σύνδεση της με αυτή και την ενεργοποίησή της. Η ενεργοποιημένη PKC καταλύει τη φωσφορυλίωση του υποδοχέα οδηγώντας σε άρση του αποκλεισμού του διαύλου των NMDA υποδοχέων από το Mg^{2+} , με αποτέλεσμα την περαιτέρω ενεργοποίησή του (Chen et al. 1992). Η ενεργοποίηση περισσότερων NMDA υποδοχέων οδηγεί στη νέα είσοδο ασβεστίου. Συγχρόνως, η ενεργοποίηση μεταβοτρόπων υποδοχέων του γλουταμικού (mGluR) προκαλεί διαμέσου G-πρωτεϊνών την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C (PLC), με επακόλουθο την υδρόλυση φωσφολιπιδίων ινοσιτόλης της μεμβράνης σε 1,4,5-τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP_3) και διακυλογλυκερόλη (DAG). Η IP_3 κινητοποιεί επιπλέον ασβέστιο από ενδοκυττάρια αποθήκες, ενώ η DAG συμμετέχει στην ενεργοποίηση της PKC (Mao et al., 1995)

Η αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου προκαλεί επίσης την ενεργοποίηση της συνθάσης της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου (NOS). Το ένζυμο αυτό ρυθμίζει τη σύνθεση της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου (NO), η οποία διαχέεται ελεύθερα διαμέσου της μεμβράνης του κυττάρου και μπορεί και δρα και στον προσυναπτικό νευρώνα (Mao et al., 1995).

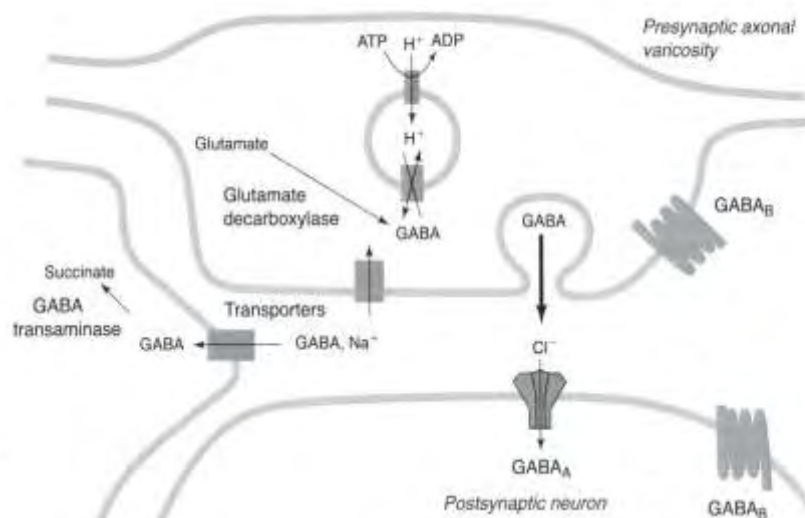
Στον υποκάμπο NMDA υποδοχείς βρίσκονται τόσο στους πυραμιδικούς νευρώνες όσο και στους ενδονευρώνες. Παρατηρούνται κυρίως στα κυτταρικά σώματα νευρώνων του υποκάμπου, όπως στην πυραμιδική στιβάδα της CA1, CA2, CA3 περιοχής και στην κοκκώδη της οδοντωτής έλικας (Krzysztof Wedzont et al., 1997). Τα υψηλότερα επίπεδα υποδοχέων NMDA στο κεντρικό νευρικό σύστημα έχουν ανιχνευτεί στη CA1 περιοχή του υποκάμπου (Ozawa et al., 1998).

1.6.2 γ-Αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) και υποδοχείς του

Το GABA (γ-αμινοβουτυρικό οξύ) είναι ο πιο σημαντικός ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ). Μαζί με τη γλυκίνη ευθύνεται για την πλειονότητα της ανασταλτικής νευροδιαβίβασης στο ΚΝΣ. Η παρουσία του GABA στον εγκέφαλο πιστοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Bazemore και τους συνεργάτες του το 1954, όταν ανακαλύψανε ότι ένας παράγοντας τον οποίο ονόμαζαν Ι και είχε απομονωθεί από τον εγκέφαλο θηλαστικών, είχε την ιδιότητα να αναστέλλει τον τάσσο-υποδοχέα στον νευρώνα της καραβίδας. Τελικά, το 1957 ταυτοποιήθηκε από τους ίδιους ότι ο παράγοντας αυτός ήταν το GABA (Bazemore et al., 1957).

Το αρχικό πρόδρομο μόριο για τη σύνθεση του GABA στον εγκέφαλο, είναι το γλουταμικό οξύ (εικόνα 10). Το γλουταμικό οξύ με τη δράση ενός ενζύμου, της αποκαρβοξυλάσης του γλουταμικού οξέος (GAD), αποκαρβοξυλιώνεται προς GABA. Η GAD είναι ένα κυτταροπλασματικό ένζυμο που απαντάται σε νευρώνες και για τη λειτουργία της είναι απαραίτητο το ένζυμο φωσφορική πυριδοξάλη (Arregui and Barer, 1980). Υπάρχουν δύο ισομορφές της GAD, η GAD65 και η GAD67 (M.B. 65 και 67 kDa, αντίστοιχα), οι οποίες παρουσιάζουν διαφορετική κατανομή εντός του GABAεργικού νευρώνα (Fucuda et al., 1997). Η GAD65 εντοπίζεται κυρίως κοντά στις νευρικές απολήξεις των προσυναπτικών νευρώνων, ενώ η GAD67 είναι διάσπαρτη στο κυτταρόπλασμα (Houser and Esclapez, 1994). Έχουν βρεθεί διαφορετικά επίπεδα mRNA των δύο ισομορφών σε απάντηση σε διαφορετικά ερεθίσματα (Bowers et al., 1998).

Το GABA μετά τη σύνθεσή του απελευθερώνεται στη συναπτική σχισμή και δεσμεύεται στους μετασυναπτικούς ή/και στους προσυναπτικούς υποδοχείς του μέσω των οποίων δρα προκαλώντας ανασταλτικά δυναμικά. Μελέτες έχουν δείξει ότι το GABA που δεν θα συνδεθεί σε κάποιο υποδοχέα επαναπροσλαμβάνεται τόσο από τους νευρώνες όσο και από τα γλοιακά κύτταρα (Schousboe and Waagepetersen, 2006). Η επαναπρόσληψη του GABA γίνεται μέσω μιας οικογένειας τεσσάρων μεταφορέων GAT1-4 (Schousboe et al., 2000). Αυτοί οι μεταφορείς βρίσκονται στα αστροκύτταρα, στους ενδονευρώνες καθώς και σε πυραμιδικά κύτταρα. Μετά την επαναπρόσληψή του, το GABA μέσω ενός ενζύμου, της τρανσαμινάσης του GABA (GABA-T), μετατρέπεται σε σουκινικό οξύ, το οποίο εισέρχεται στον κύκλο του Krebs (εικόνα 13).

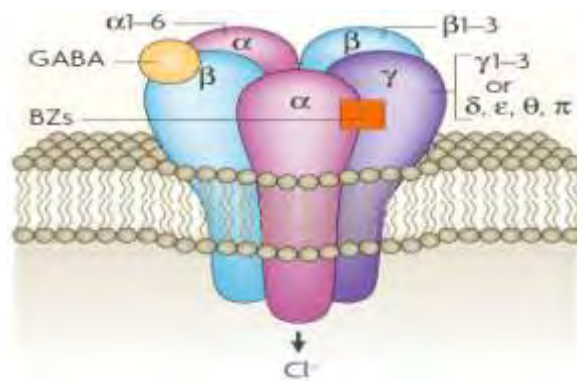


Εικόνα 13: Ο κύκλος του GABA. Ο ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής GABA συντίθεται από γλουταμικό οξύ μέσω της δράσης δύο ενζύμων, της GAD65 και της GAD67. Μετά την απελευθέρωσή του στη συναπτική σχισμή, το GABA προσλαμβάνεται τόσο από νευρώνες όσο και από κύτταρα της γλοίας. Εκεί, το GABA μετατρέπεται πάλι σε γλουταμικό ή σουκινικό από το ένζυμο τρανσαμινάση του GABA. Στο διάγραμμα επίσης φαίνονται οι GABA_A και GABA_B υποδοχείς. Οι GABA_B υποδοχείς βρίσκονται τόσο σε προσυναπτικούς όσο και σε μετασυναπτικούς νευρώνες (The Hippocampus Book, Oxford University Press, 2007; 218-220).

Οι δράσεις του GABA πραγματοποιούνται μέσω τριών διαφορετικών ειδών υποδοχέων: τους ιοντοτρόπους GABA_A, τους μεταβολοτρόπους GABA_B και τους ιοντοτρόπους GABA_C υποδοχείς.

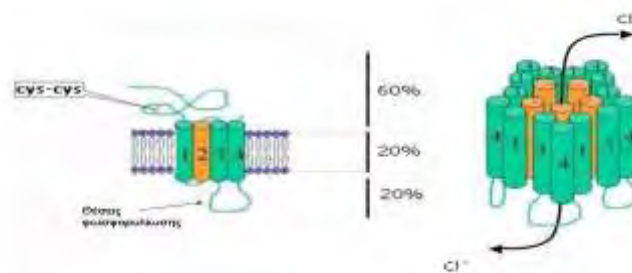
GABA_A υποδοχείς

Οι GABA_A υποδοχείς είναι διαμεμβρανικές ετερο-πενταμερείς πρωτεΐνες με μοριακό βάρος 220-400 kDa (Macdonald and Olsen, 1994), που εκφράζονται στο ΚΝΣ και στο Περιφερικό Νευρικό Σύστημα (ΠΝΣ). Οι υπομονάδες του GABA_A είναι διατεταγμένες σε σχήμα δακτυλιδιού και σχηματίζουν στο κέντρο πόρο διαπερατό σε ιόντα χλωρίου (Barker and Ranson, 1978). Μέχρι σήμερα έχουν χαρακτηριστεί πολλές υπομονάδες που συμμετέχουν στο σχηματισμό των GABA_A υποδοχέων στον εγκέφαλο των θηλαστικών. Αυτές είναι οι α(1-6), β(1-3), γ(1-3), δ, ε, π και θ (Mehta and Tichu, 1999) (εικόνα 14). Ωστόσο, οι περισσότεροι GABA_A υποδοχείς στον ιππόκαμπο αποτελούνται από δύο υπομονάδες α και δύο β μαζί με μία γ ή δ υπομονάδα.



Εικόνα 14: Σχηματική απεικόνιση των υπομονάδων του GABA_A υποδοχέα (Jacob et al., 2008).

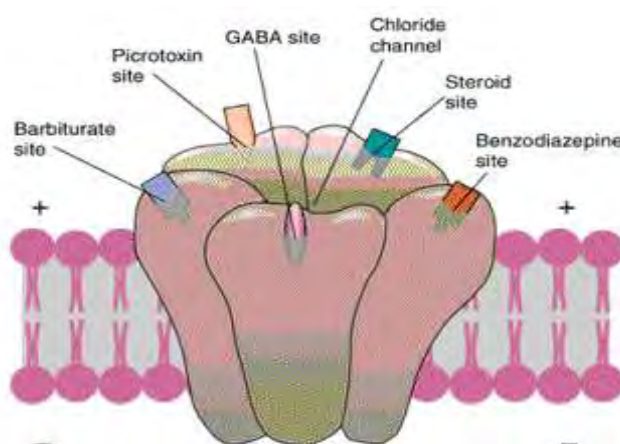
Κάθε υπομονάδα αποτελείται από ένα υδρόφοβο αμινοτελικό τμήμα με αρκετές θέσεις γλυκοζυλίωσης και μία θηλιά κυστεΐνης, που σχηματίζεται από δύο συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης. Ακολουθούν τέσσερα διαμεμβρανικά τμήματα (M1-M4). Μεταξύ του τρίτου και του τέταρτου δημιουργείται ένας ενδοκυτταρικός βρόγχος που περιέχει πιθανά θέσεις φωσφορυλίωσης (εικόνα 15).



Εικόνα 15: Αριστερά: Μία υπομονάδα του GABA_A υποδοχέα. Διακρίνεται η θηλιά κυστεΐνης (cys-cys), τα 4 διαμεμβρανικά τμήματα και ο ενδοκυτταρικός βρόγχος με πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης. Δεξιά: Πενταμερές GABA_A υποδοχέας. Ο διάυλος χλωρίου δημιουργείται από το δεύτερο διαμεμβρανικό τμήμα κάθε υπομονάδας (τροποποιημένη από Moss and Smart, 2001).

Η δέσμευση του GABA στον GABA_A υποδοχέα έχει ως αποτέλεσμα τη διάνοιξή του και την είσοδο ιόντων χλωρίου στο εσωτερικό του νευρώνα, καθώς η συγκέντρωσή τους στον εξωκυττάριο χώρο είναι μεγαλύτερη. Αυτή η εισροή νέων αρνητικών φορτίων στο κύτταρο διαταράσσει το δυναμικό ηρεμίας του νευρώνα και έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της διεγερσιμότητας του νευρώνα (Sieghart et al., 1995). Ο GABA_A υποδοχέας απευαισθητοποιείται όταν το GABA παραμένει για μεγάλο χρονικό διάστημα προσδεσμένο σε αυτόν. Σε υψηλές συγκεντρώσεις του GABA η απευαισθητοποίηση συμβαίνει πιο γρήγορα σε σύγκριση με χαμηλότερες συγκεντρώσεις (Sieghart et al., 1995).

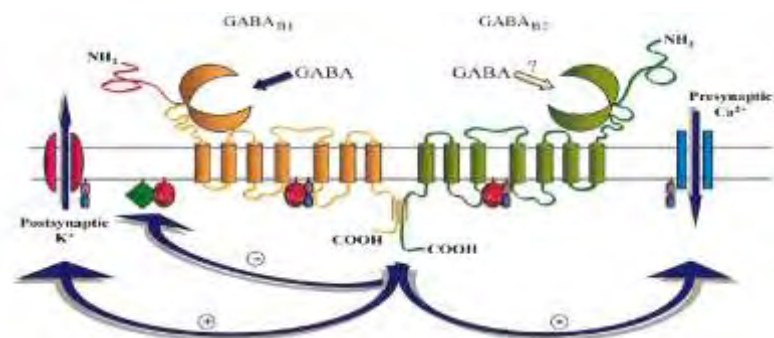
Φαρμακολογικά οι GABA_A υποδοχείς ξεχωρίζουν από τις άλλες τάξεις υποδοχέων του GABA λόγω της ευαισθησίας τους στον συναγωνιστικό ανταγωνιστή bicuculline. Άλλοι ανταγωνιστές του GABA_A είναι η πικροτοξίνη, η πεντυλενοτετραζόλη, το SR 95531, το TBPS και τα ιόντα Zn²⁺ (Macdonald and Olsen, 1994). Εκτός από το GABA, ο πιο γνωστός αγωνιστής των GABA_A υποδοχέων είναι η muscimol (Chebib and Jonston, 1999). Τέλος, οι GABA_A υποδοχείς θεωρούνται πολύ σημαντικοί γιατί πολλά σημαντικά φάρμακα όπως οι βενζοδιαζεπίνες, τα βαρβιτουρικά, τα νευροστεροειδή, η αιθανόλη αλλά και κάποια αντεπιληπτικά και γενικά αναισθητικά αλληλεπιδρούν με αυτούς τους υποδοχείς (εικόνα 16).



Εικόνα 16: Σχηματική απεικόνιση του GABA_A υποδοχέα με τις θέσεις δέσμησης του GABA και φαρμάκων (<http://www.dormivigilia.com>).

Η έκφραση των υπομονάδων των βασικών υποτύπων του GABA_A παρουσιάζει διαφορές μεταξύ του διαφραγματικού και του κροταφικού ιπποκάμπου (Sotiriou et al., 2005). Πιο συγκεκριμένα, στη CA1 περιοχή η έκφραση των α1, β2 και γ2 υπομονάδων είναι σημαντικά χαμηλότερη, ενώ η έκφραση των α2 και β1 υπομονάδων είναι σημαντικά υψηλότερη στον κροταφικό σε σχέση με το διαφραγματικό ιππόκαμπο. Επειδή η α1 υπομονάδα συνδέεται με τη β2, ενώ η α2 με τη β1 (Somogyi et al., 1996), η αναλογία των α1/β2/γ2 και α2/β1/γ2 υποτύπων του GABA_A υποδοχέα διαφέρει μεταξύ των δύο πόλων του ιπποκάμπου με τον πρώτο να επικρατεί στον διαφραγματικό, ενώ τον δεύτερο στον κροταφικό ιππόκαμπο (Sotiriou et al, 2005). Επιπρόσθετα, στην οδοντωτή έλικα τα επίπεδα α4, β3 και δ υπομονάδων, και συνεπώς τα επίπεδα του α4/β3/δ υπότυπου του GABA_A υποδοχέα βρέθηκαν χαμηλότερα στον κροταφικό ιππόκαμπο (Sotiriou et al., 2005).

GABA_B υποδοχείς



Εικόνα 17: Σχηματική αναπαράσταση του GABA_B υποδοχέα. Οι υπομονάδες GABA_{B1} και GABA_{B2} αλληλεπιδρούν μέσω των καρβοξυ-τελικών τμημάτων τους. Το αμινο-τελικό άκρο της GABA_{B1} υπομονάδας περιέχει την θέση δέσμευσης του GABA και αγωνιστών. Δεν είναι γνωστό αν και η GABA_{B2} υπομονάδα συμβάλει στη δέσμευση του GABA. Επιπλέον, φαίνεται η ανασταλτική δράση του υποδοχέα στην αδενυλική κυκλάση μέσω G πρωτεϊνών, καθώς και η δράση του στους προσυναπτικούς διαύλους ασβεστίου και στους μετασυναπτικούς διαύλους καλίου (Couve et al., 2000).

Ο GABA_B υποδοχέας είναι ένας μεταβοτροπικός υποδοχέας, ο οποίος συνδέεται με G-πρωτεΐνες. Σε αντίθεση με άλλους υποδοχείς αυτής της κατηγορίας, ο GABA_B είναι διμερής, αποτελούμενος από δύο υπομονάδες, τις GABA_{B1} και GABA_{B2}, καθεμιά από τις οποίες έχει την κλασική δομή των επτά διαμεμβρανικών περιοχών αυτής της οικογένειας υποδοχέων (εικόνα 17) (Couve et al., 2000).

Οι GABA_B υποδοχείς είναι συζευγμένοι με κανάλια ιόντων ασβεστίου ή καλίου μέσω G-πρωτεϊνών και ενεργοποιούν συστήματα δεύτερου αγγελιοφόρου (μονοπάτι αδενυλικής κυκλάσης και φωσφολιπάσης A2) μέσα στο κύτταρο. Έτσι, σε αντίθεση με τους ιοντοτροπικούς GABA_A υποδοχείς που διενεργούν τη γρήγορη φάση της αναστολής (Macdonald and Olsen, 1994), οι GABA_B υποδοχείς διενεργούν την αργή φάση της αναστολής και δεν επηρεάζονται από ανταγωνιστές των GABA_A υποδοχέων. Ενεργοποιούνται από το GABA και τον αγωνιστή μπακλοφαίνη, ενώ η δράση τους αναστέλλεται από τη σακλοφένη και τη φακλοφένη (Seabrook et al., 1990).

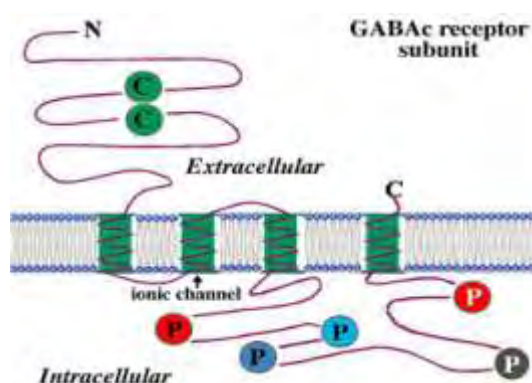
Οι GABA_B υποδοχείς εντοπίζονται τόσο στους μετασυναπτικούς νευρώνες όσο και στους προσυναπτικούς νευρώνες. Μετασυναπτικά, συνδέονται με διαύλους καλίου μέσω ενεργοποίησης G πρωτεϊνών, οδηγώντας στην εμφάνιση ενός αργού αλλά μεγάλου σε διάρκεια και πλάτος ανασταλτικού μετασυναπτικού δυναμικού (Misgeld et al., 1995). Προσυναπτικά, η ενεργοποίησή τους υπερπολώνει την

κυτταρική μεμβράνη και οδηγεί σε αναστολή διαύλων ασβεστίου, με αποτέλεσμα να μειώνεται η ασβέστιο-εξαρτώμενη απελευθέρωση νευροδιαβιβαστή (Misgeld et al., 1995).

GABA_C υποδοχείς

Οι GABA_C υποδοχείς διακρίνονται από τους GABA_A και GABA_B υποδοχείς λόγω της μη ευαισθησίας τους στη bicuculline και τη μπακλοφένη, αντίστοιχα, καθώς και από το ότι η λειτουργία τους δεν επηρεάζεται από τις βενζοδιαζεπίνες και τα βαρβιτουρικά. Αντιθέτως, παρουσιάζουν ιδιαίτερη ευαισθησία στον αγωνιστή cis-4-αμινοκροτονικό οξύ (CACA), ενώ η δράση τους αναστέλλεται από το τετραυδροπυριδινό-4-μεθυλοφωσφονικό οξύ (TPMPA) (Bormann and Feigenspan, 1995; Johnston et al., 1996).

Πρόκειται για έναν πενταμερή ιοντοτροπικό υποδοχέα που συνδέεται με διάλυτο χλωρίου (εικόνα 18). Συνίσταται από τις υπομονάδες ρ(1-3) και εντοπίζεται κυρίως στον αμφιβληστροειδή χιτώνα του οφθαλμού. Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν πως υπάρχουν λειτουργικοί υποδοχείς και στον ιππόκαμπο (Alakuijala et al., 2006).



Εικόνα 18: Δομή GABA_C υποδοχέα και υπομονάδων του

(<http://webvision.med.utah.edu/book/part-v-phototransduction-in-rods-and-cones/gabac-receptors-in-the-vertebrate-retina/>).

1.7 Διαφορές ραχιαίου και κοιλιακού ιπποκάμπου-Υπόστρωμα για διαφορετικές λειτουργίες

Διάφορες μελέτες έχουν γίνει καταδείξει διαφοροποίηση του ιπποκάμπου κατά μήκος του επιμήκους άξονά του. Όσον αφορά στη λειτουργία του, έχουν περιγραφεί τα παρακάτω τρία μοντέλα (Small, 2002). Σύμφωνα με το πρώτο ο ιππόκαμπος

αποτελείται από έναν αριθμό παράλληλων και λειτουργικά ανεξάρτητων εγκάρσιων κυκλωμάτων στα οποία δεν συμπεριλαμβάνεται σύνδεση μεταξύ των στιβάδων με αποτέλεσμα ο επιμήκης άξονας να μην θεωρείται ότι αποτελεί ενιαίο κύκλωμα. Στο δεύτερο μοντέλο, ολόκληρος ο ιππόκαμπος αποτελεί ένα απλό εγκάρσιο κύκλωμα ανεξάρτητα από το σημείο εισόδου της πληροφορίας αφού αυτή θα μεταδοθεί ακολούθως κατά τον επιμήκη άξονα. Στο τρίτο μοντέλο, το οποίο θεωρείται και το πιο αποδεκτό σήμερα, ο ιππόκαμπος αποτελείται από διαδοχικές λειτουργικά περιοχές οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους (εικόνα 19).

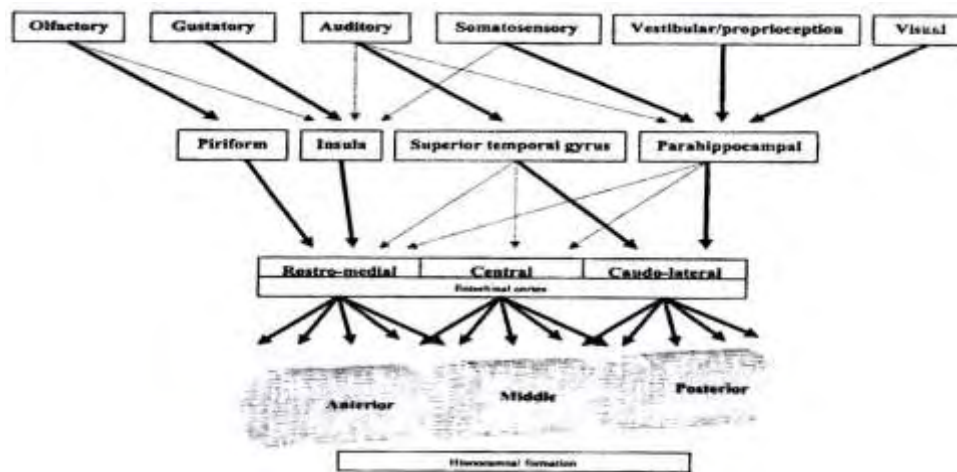


Εικόνα 19: Τα τρία μοντέλα λειτουργίας του ιπποκάμπου (από Γεωργόπουλο 2008; τροποποιημένο από Small, 2002)

1.7.1 Διαφοροποίηση στο επίπεδο των νευρωνικών κυκλωμάτων

Οι διακριτοί ρόλοι του ραχιαίου και του κοιλιακού ιπποκάμπου βασίζονται κυρίως στο διαφορετικό μοτίβο των συνδέσεών τους με άλλες περιοχές του εγκεφάλου (εικόνα 20; Moser and Moser, 1998; Small, 2002).

Όσον αφορά τις προσαγωγές συνδέσεις, ο διαφραγματικός ιππόκαμπος προσλαμβάνει πληροφορίες από αισθητικά και συνειρμικά φλοιϊκά κέντρα μέσω οδών που διέρχονται από την εξωτερική μοίρα του ενδορινικού φλοιού (Deacon et al., 1983; Room et al., 1986). Αντιθέτως, οι προσαγωγές ίνες από την αμυγδαλή, τον ιδίως υποθάλαμο, τους πυρήνες της υποθαλάμιας χώρας και το έσω τμήμα της διαγώνιας ταινίας του Broca συνάπτονται στην εσωτερική μοίρα του ενδορινικού φλοιού και στη συνέχεια, ως επί το πλείστον, στον κροταφικό ιππόκαμπο (Ruth et al., 1982).



Εικόνα 20: Το μοτίβο των συνδέσεων του ιπποκάμπου με άλλες περιοχές του εγκεφάλου κατά μήκος του ραχιαίου-κοιλιακού άξονά του (Small, 2002).

Σχετικά με τις απαγωγές συνδέσεις, οι απαγωγές ίνες της διαφραγματικής μοίρας του υποθέματος του ιπποκάμπου καταλήγουν κυρίως στα μαστία και στους πρόσθιους πυρήνες του θαλάμου, ενώ οι ίνες που εκφύονται από τα κροταφικά τμήματα του υποθέματος προβάλλουν στην οσφρητική περιοχή, στην αμυγδαλή, στον επικλινή πυρήνα του διαφράγματος, στους πρόσθιους πυρήνες του υποθαλάμου καθώς και στα μονοαμινεργικά κέντρα του διάμεσου εγκεφάλου (Risold and Swanson, 1996).

Σε σχέση με την αμυγδαλή, αξίζει να σημειώσουμε ότι μόνο ο κροταφικός ιππόκαμπος προβάλλει σε αυτήν. Επίσης, τα πεδία του ενδορινικού φλοιού που δέχονται ίνες από τον κροταφικό ιππόκαμπο είναι εκείνα τα οποία προβάλλουν στην αμυγδαλή. Αντιστοίχως, η αμυγδαλή παρέχει ίνες μόνο στον κροταφικό ιππόκαμπο, καθώς και στα πεδία εκείνα του ενδορινικού φλοιού τα οποία δέχονται ίνες από τον κροταφικό ιππόκαμπο (Pitkanen et al., 2000).

1.7.2 Διαφοροποίηση σε βιοχημικό επίπεδο

A) Κατανομή νευροδιαβιβαστών

Ο κροταφικός ιππόκαμπος φαίνεται να εμφανίζει μεγαλύτερες συγκεντρώσεις GABA, γλουταμικού οξέος και γλουταμίνης από ότι ο διαφραγματικός. Όσον αφορά τα επίπεδα του ασπαρτικού, της γλυκίνης και του νευροπεπτιδίου Y, ο Hortnagl δεν παρατήρησε διαφορές μεταξύ των δύο περιοχών του ιπποκάμπου, όμως κατά τον Jeltsch η γλυκίνη υπερτερεί στο διαφραγματικό ιππόκαμπο. Η ταυρίνη και η σερίνη επίσης φαίνεται να υπερισχύουν στον διαφραγματικό ιππόκαμπο (Hortnagl et al.,

1991; Jeltsch et al., 1994). Αντίθετα, η σεροτονίνη και η νοραδρεναλίνη εμφανίζονται σε υψηλότερα επίπεδα στον κροταφικό υπόκαμπο (Hornagl et al., 1991) και το ίδιο φαίνεται να ισχύει και για την TRH (Low et al., 1989).

B) Κατανομή υποδοχέων

Όσον αφορά τους NMDA υποδοχείς, βρέθηκε ότι βρίσκονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στο διαφραγματικό υπόκαμπο, στη βοθριώδη-μοριώδη στιβάδα της CA1 περιοχής και στη μοριώδη στιβάδα της οδοντωτής έλικας. Αντιθέτως, στις υπόλοιπες περιοχές της οδοντωτής έλικας η συγκέντρωση τους βρέθηκε αυξημένη στον κροταφικό υπόκαμπο (Martens et al., 1998). Οι υποδοχείς αδενοσίνης τύπου A1 εντοπίστηκαν σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στο διαφραγματικό υπόκαμπο (Lee et al., 1983), ενώ οι υποδοχείς ωκυτοκίνης υπερτερούν αριθμητικά στον κροταφικό υπόκαμπο (Van Leeuwen et al., 1985). Οι υποδοχείς του NPY του κροταφικού λοβού υπερσχύουν εκείνων του διαφραγματικού (Kohler et al., 1987), παρόλο που σύμφωνα με άλλους ερευνητές (Hornagl et al., 1991) τα επίπεδα του NPY δε φαίνεται να διαφοροποιούνται μεταξύ των δύο μοιρών.

1.7.3 Διαφοροποίηση σε ανατομικό επίπεδο

Κατανομή ενδονευρώνων

Η ραχιαία και κοιλιακή μοίρα φαίνεται να διαφέρουν ως προς τη σύσταση των ενδονευρώνων. Η σημασία της διαφοράς αυτής σε λειτουργικό επίπεδο δεν είναι ξεκάθαρη, ωστόσο παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον το γεγονός ότι πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η κοιλιακή μοίρα παρουσιάζει αυξημένη επιρρέπεια προς επιληπτοειδείς εκφορτίσεις (Burnham et al., 1975; Racine et al., 1977).

1.7.4 Διαφοροποίηση στην ισχαιμία

Ο εγκέφαλος είναι πολύ ευαίσθητος στην υποξία και την ισχαιμία, καθώς έχει πολύ υψηλές μεταβολικές ανάγκες και πολύ μικρά αποθέματα οξυγόνου και γλυκόζης (Siesjo, 1978). Σε ανθρώπους και ζώα, το πεδίο CA1 του υποκάμπειου σχηματισμού είναι μία από τις πλέον ευαίσθητες περιοχές του εγκεφάλου στην ισχαιμία, ενώ οι παρακείμενες περιοχές CA3 και οδοντωτή έλικα είναι σχετικά ανθεκτικές. Ευαίσθητα είναι κυρίως τα πυραμιδοειδή κύτταρα. Οι περισσότεροι διάμεσοι νευρώνες επιβιώνουν, ακόμα και για μήνες, μετά το ισχαιμικό επεισόδιο (Schmidt-Kastner and Freud, 1991). Ωστόσο, παρατηρείται σημαντική διαφοροποίηση της ευαισθησίας του

ιπποκάμπειου σχηματισμού στην ισχαιμία και κατά τον διαμήκη άξονά του. Το ραχιαίο τμήμα του ιπποκάμπειου σχηματισμού είναι περισσότερο ευαίσθητο από το κοιλιακό (Akai and Yanagihara, 1993).

Τα αίτια της μεγαλύτερης ανθεκτικότητας του κοιλιακού ιπποκάμπου στην ισχαιμία δεν έχουν ακόμα διευκρινισθεί. Ωστόσο σύμφωνα με μελέτες, ο κοιλιακός ιπποκάμπος παρουσιάζει σημαντικά υψηλότερα επίπεδα αιμάτωσης σε σύγκριση με τον διαφραγματικό. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε σημαντικά μεγαλύτερη πυκνότητα αγγείων μεγάλης διαμέτρου στον κοιλιακό ιπποκάμπο, ενώ και οι δυο πόλοι του ιπποκάμπου εμφάνιζαν την ίδια πυκνότητα αγγείων μεσαίας διαμέτρου. Αντιθέτως, όσον αφορά το δίκτυο των τριχοειδών αγγείων παρατηρήθηκε σημαντικά μεγαλύτερη πυκνότητά του στον ραχιαίο ιπποκάμπο για τη CA1 και τη CA3 περιοχή (Grivas et al., 2003). Αυτό το πυκνότερο δίκτυο αιμάτωσης και η μεγαλύτερη διάμετρος των αγγείων του κοιλιακού ιπποκάμπου σε σχέση με τον ραχιαίο, ίσως να δικαιολογούν στην μεγαλύτερη ανθεκτικότητά του στην ισχαιμία (Grivas et al., 2003).

1.7.5 Ο ρόλος του ραχιαίου ιπποκάμπου στη χωρική μνήμη

Οι μελέτες της λειτουργίας τόσο του διαφραγματικού όσο και του κροταφικού ιπποκάμπου σε πειραματόζωα βασίζονται κυρίως σε πρόκληση τοπικών καταστροφών και στη συνέχεια παρατήρηση της συμπεριφοράς του ζώου καθώς και των επιδόσεών του σε διάφορες δοκιμασίες. Για παράδειγμα, ένα σημαντικό εύρημα είναι ότι η μάθηση της δοκιμασίας του λαβύρινθου εξασθενεί σε αρουραίους με επιλεκτική καταστροφή του διαφραγματικού, αλλά όχι και του κροταφικού ιπποκάμπου (Hughes 1965; Sinnamon et al., 1978). Συγκριτικές μελέτες σε αρουραίους με πιο επιλεκτικές βλάβες των δύο πόλων του ιπποκάμπου επιβεβαίωσαν ότι ο διαφραγματικός ιπποκάμπος έχει κύριο ρόλο στη χωρική μάθηση (Εικόνα 21). Το μέγεθος της λειτουργικής βλάβης ήταν ανάλογο με το ποσοστό καταστροφής του διαφραγματικού ιπποκάμπου. Τα πειραματόζωα μπορούσαν να αναπτύξουν χωρική μνήμη ακόμα κι αν παρέμενε μόνο το 20-30% του ιστού ανέπαφο αρκεί να επρόκειτο για το διαφραγματικό τμήμα, κάτι που δείχνει ότι υπάρχει μεγάλη ανοχή στην εμφάνιση σοβαρής λειτουργικής βλάβης (Moser et al., 1995). Πιο πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι και ο κροταφικός ιπποκάμπος είναι ικανός για χωρική μάθηση, κατά τη δοκιμασία του υδάτινου λαβύρινθου, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες εκπαίδευσης των πειραματόζωων (de Hoz et al., 2003).



Εικόνα 21: Ο ακτινωτός λαβύρινθος είναι μία χαρακτηριστική δοκιμασία χωρικής μνήμης. Τα πειραματόζωα τοποθετούνται στο κέντρο και εισέρχονται σε κάθε βραχίονα ελεύθερα και συλλέγουν την τροφή. Σε μικρό χρονικό διάστημα μαθαίνουν να εισέρχονται μόνο μία φορά σε κάθε βραχίονα. Βλάβες στον διαφραγματικό ιππόκαμπο έχουν ως αποτέλεσμα να μην θυμούνται ποιους βραχίονες έχουν ήδη επισκεφτεί, οπότε εισέρχονται ξανά στους ίδιους (Carew 2000, Behavioral Neurobiology, Chapter 12).

Η χωρική μάθηση βασίζεται πιθανώς στη διαφορετική νευρωνική επεξεργασία στον διαφραγματικό σε σχέση με τον κροταφικό ιππόκαμπο. Αυτή η υπόθεση θα ίσχυε αν υπήρχαν κύτταρα με διαφορετικά πρότυπα εκφόρτισης στους δύο πόλους κατά τη χωρική μάθηση. Πράγματι, και στους δύο πόλους του ιππόκαμπου έχουν βρεθεί ειδικά κύτταρα θέσης (place cells) τα οποία συμβάλλουν στην χωρική μνήμη καθώς παρουσιάζουν διαφορετικό τρόπο εκφόρτισης ανάλογα με το χώρο στον οποίο βρίσκεται το πειραματόζωο (Jung et al., 1994; Poucet et al., 1994). Όμως, στον κροταφικό ιππόκαμπο η αναλογία αυτών των κυττάρων είναι μικρότερη ενώ τα πεδία θέσης είναι γενικά ευρύτερα και λιγότερο εξειδικευμένα σε σύγκριση με τον διαφραγματικό ιππόκαμπο, υποδηλώνοντας ότι διαφορετικά είδη ανάλυσης πραγματοποιούνται στη διαφραγματική και κροταφική μοίρα του ιππόκαμπου (Jung et al., 1994).

Μελέτες δείχνουν ότι η επεξεργασία της πληροφορίας στον ιππόκαμπο πιθανώς να παρουσιάζει πόλωση και σε άλλα είδη. Στα πρωτεύοντα ο προσανατολισμός του ιππόκαμπου είναι διαφορετικός από των τρωκτικών, όπως έχουμε ήδη αναφέρει. Συγκεκριμένα, ο πρόσθιος ιππόκαμπος των πρωτευόντων αντιστοιχεί στον κροταφικό των τρωκτικών, ενώ ο οπίσθιος αντιστοιχεί στον διαφραγματικό. Πίθηκοι που εκπαιδεύτηκαν σε μια δοκιμασία χωρικής μνήμης, παρουσίασαν μεγαλύτερη ενεργότητα νευρώνων στον οπίσθιο ιππόκαμπο κατά την περίοδο καθυστέρησης πριν την απόκριση (Colombo et al., 1998). Στο ίδιο πείραμα, σε μια δοκιμασία μη χωρικής μνήμης, η δραστηριότητα των νευρώνων ήταν παρόμοια και στους δύο πόλους του ιππόκαμπου.

Ο ρόλος του οπίσθιου ιππόκαμπου στα πρωτεύοντα μπορεί να επεκτείνεται και πέρα από τη χωρική μάθηση. Τεχνικές λειτουργικής απεικόνισης της εγκεφαλικής δραστηριότητας κατά την επιτυχή κωδικοποίηση λέξεων έδειξαν σημαντικά μεγαλύτερη ενεργοποίηση του οπίσθιου ιππόκαμπου σε σχέση με τον πρόσθιο (Fernandez et al., 1998). Η ένταση του σήματος στον οπίσθιο ιππόκαμπο ήταν ανάλογη του αριθμού των επιτυχώς κωδικοποιημένων λέξεων. Μια παρόμοια πόλωση της δραστηριότητας του ιππόκαμπου παρατηρείται και κατά την κωδικοποίηση οπτικών παραστάσεων (Rombouts et al., 1997) και καινούργιων εικόνων (Stern et al., 1996). Εκφύλιση του ιππόκαμπου σε όλο τον επιμήκη άξονά του έχει ως αποτέλεσμα παλίνδρομη αμνησία (Zola-Morgan et al., 1986), αλλά αυτή δεν παρατηρείται μετά από μέτρια συρρίκνωση της πρόσθιας περιοχής του ιππόκαμπου (Sullivan et al., 1995). Όλα τα παραπάνω υποδηλώνουν ότι ο ιππόκαμπος μπορεί να είναι λειτουργικά διαφοροποιημένος και στους ανθρώπους, με την οπίσθια περιοχή να είναι υπεύθυνη, εκτός από χωρικές, και για αρκετές μη χωρικές μνημονικές λειτουργίες.

1.7.6 Ο ρόλος του κροταφικού ιπποκάμπου

Ο κροταφικός ιπποκάμπος σχηματισμός έχει ισχυρές και εξειδικευμένες απαγωγές συνδέσεις με υποφλοιϊκές περιοχές του πρόσθιου εγκεφάλου, όπως ο πρόσθιος υποθάλαμος και η αμυγδαλή (Amaral, 1986; Witter et al., 1989b; Witter and Amaral, 1991; Canteras and Swanson 1992; Risold and Swanson 1997; Risold et al., 1997; Burwell and Amaral, 1998). Αυτή η διασύνδεση υποδεικνύει ότι ο κροταφικός ιππόκαμπος μπορεί να αλληλεπιδρά με αυτόνομα, ενδοκρινικά, αμυντικά, κοινωνικά, αναπαραγωγικά και συναισθηματικά συστήματα ελέγχου. Η πληροφορία για την εσωτερική κατάσταση του ζώου μπορεί να φτάσει στον κροταφικό ιππόκαμπο μέσω υποθαλαμικών συνδέσεων με πυρήνες του θαλάμου και της αμυγδαλής, καθώς και με άμεσες συνδέσεις (Risold et al., 1997).

Μια υποθαλαμική λειτουργία που πιθανώς να επηρεάζεται από τον κροταφικό ιππόκαμπο είναι ο έλεγχος των νευροενδοκρινικών και αυτόνομων αποκρίσεων. Το κροταφικό τμήμα του ιππόκαμπου, μέσω του πλευρικού διαφράγματος, προβάλλει εξειδικευμένα σε κυτταρικά σύνολα, στην περικοιλιακή ζώνη του υποθαλάμου καθώς και σε διάφορους υποθαλαμικούς πυρήνες, που σχετίζονται με λειτουργίες του νευροενδοκρινικού και αυτόνομου νευρικού συστήματος (Loewy, 1991; Risold and Swanson, 1997). Βλάβες του κροταφικού τμήματος του ιππόκαμπου έχουν ως αποτέλεσμα την αυξημένη έκκριση γλυκοκορτικοειδών σε επίμυς και σε πύθικους

(Kim and Routtenberg, 1976; Murphy et al., 1979). Επιπλέον, μη επιλεκτικές βλάβες στον κροταφικό υπόκαμπο αυξάνουν τη γαστρική έκκριση μετά από παρατεταμένο στρες (Henke, 1990). Με βάση τις ανατομικές του συνδέσεις, ο κροταφικός υπόκαμπος μπορεί να επηρεάζει το αυτόνομο νευρικό σύστημα, την έκκριση ορμονών, την αναπαραγωγή, τη λήψη τροφής και το συναίσθημα (Herman et al. 1998). Τέλος, έχειδειχθεί ότι επιλεκτικές βλάβες στον κροταφικό υπόκαμπο έχουν ως αποτέλεσμα την αλλοίωση της ικανότητας αντίληψης της εσωτερικής κατάστασης του επίμυος (Hock and Bunsey, 1998).

Ο κροταφικός υπόκαμπος είναι απαραίτητος για αμυντική και σχετιζόμενη με φόβο συμπεριφορά (Kjelstrup et al., 2002; Pentkowski et al., 2006). Πειραματόζωα με καταστροφή του κροταφικού υπόκαμπου δεν εμφάνισαν σε φυσιολογικό βαθμό συμπτώματα φόβου και τα ζώα παρουσίασαν αυξημένο βαθμό διερεύνησης του περιβάλλοντος. Αντίθετα, επιλεκτικές καταστροφές σε μεγάλο βαθμό στον διαφραγματικό υπόκαμπο δεν επηρέασαν τη φυσιολογική συμπεριφορά φόβου. Άλλα πειράματα έχουν δείξει ότι ο εξαρτημένος φόβος, δηλαδή το αίσθημα φόβου που αναπτύσσεται μετά από μια επαναλαμβανόμενη αρνητική εμπειρία και συνδέεται με τον περιβάλλοντα χώρο, δεν εξαρτάται αποκλειστικά από τον ένα πόλο του υπόκαμπου, αλλά φαίνεται ότι για τη συγκεκριμένη συμπεριφορά ευθύνονται μικροκυκλώματα και στους δύο πόλους του υπόκαμπου (Rudy and Matus-Amat, 2005). Φαίνεται, επομένως, ότι ο μη εξαρτημένος φόβος βασίζεται σε κυκλώματα του υποκάμπου διαφορετικά από αυτά που είναι υπεύθυνα για τον εξαρτημένο φόβο.

1.7.7 Κροταφικός υπόκαμπος και επιληψία

Ο υπόκαμπος αποτελεί μια από τις εγκεφαλικές περιοχές που είναι πιο επιδεκτικές σε επιληπτική δραστηριότητα (Green and Scheetz, 1964). Αυτή η ευαισθησία του υπόκαμπου για επιληψία φαίνεται να αυξάνει κατά τον επιμήκη άξονα του με το κροταφικό του τμήμα (κοιλιακό) να είναι πιο επιρρεπές στις επιληπτικές εκφορτίσεις από το διαφραγματικό τμήμα (ραχιαίο) του όπως έχειδειχθεί σε πολλά *in vivo* και *in vitro* πειραματικά μοντέλα (Elul et al., 1964; Racine et al., 1977; Gilbert et al., 1985; Borck and Jefferys, 1999). Στον άνθρωπο, ο πρόσθιος υπόκαμπος εμφανίζεται ως η πιο κοινή εγκεφαλική περιοχή για την έναρξη των επιληπτικών κρίσεων (Goldring et al, 1992). Με τα ευρήματα αυτά συμφωνούν και παρατηρήσεις σε ασθενείς με χρόνια επιληψία του κροταφικού λοβού στους οποίους

ο πρόσθιος ιππόκαμπος υφίσταται μεγαλύτερο ποσοστό ανατομικών βλαβών σχετιζόμενων με την επιληψία (Masukawa et al., 1995).

Μετά από ηλεκτρικό ερεθισμό (kindling) της CA1 περιοχής και της περιοχής της οδοντωτής έλικας των δύο πόλων του ιπποκάμπου, ο κοιλιακός ιππόκαμπος παρουσιάζει χαμηλότερο ουδό για την επαγωγή επιληπτοειδών εκφορτίσεων σε σύγκριση με το ραχιαίο ιππόκαμπο (Racine et al., 1977). Επιπλέον, σε *in vitro* πειραματικό μοντέλο και σε περιβάλλον αυξημένου εξωκυττάριου καλίου, μετά από διέγερση των παράπλευρων ινών Schaffer, τα πυραμιδικά κύτταρα του κοιλιακού ιπποκάμπου παρουσιάζουν μεγαλύτερη τάση για εκφορτίσεις σε σύγκριση με τα αντίστοιχα κύτταρα του ραχιαίου ιπποκάμπου (Gilbert et al., 1985). Ο κοιλιακός ιππόκαμπος, επίσης, απαιτεί μικρότερες δόσεις οπιοειδών για να εμφανίσει επιληπτοειδείς εκφορτίσεις σε σύγκριση με το ραχιαίο ιππόκαμπο (Lee et al., 1990), ενώ τελευταίες μελέτες δείχνουν ότι οι τομές που προέρχονται από τον κροταφικό έχουν χαμηλότερο ουδό στην εκδήλωση επιληπτικών κρίσεων σε μοντέλα με αυξημένο ενδοκυττάριο κάλιο, καθώς και σε μοντέλο που δημιουργείται μετά από την χορήγηση bicuculline (Borck and Jefferys, 1999).

Σύμφωνα με μελέτες, η συναπτική αναστολή στην CA1 περιοχή του κροταφικού ιπποκάμπου είναι μικρότερη από τον διαφραγματικό ιππόκαμπο (Paratheodoropoulos et al., 2002). Οι διαφορές στη συναπτική αναστολή ανάμεσα σε διαφραγματικό και κροταφικό τμήμα του ιπποκάμπου θα μπορούσε να οφείλεται σε διαφορές που αφορούν τον πληθυσμό και τη θέση των GABA_A υποδοχέων.

Ωστόσο, οι λόγοι που καθιστούν τον κροταφικό ιππόκαμπο πιο επιρρεπή στην επιληπτογένεση παραμένουν άγνωστοι.

1.8 Ιππόκαμπος και ισχαιμία

Είναι γνωστό ότι ο εγκέφαλος είναι πολύ ευαίσθητος στην υποξία και την ισχαιμία, καθώς έχει πολύ υψηλές μεταβολικές ανάγκες και πολύ μικρά αποθέματα οξυγόνου και γλυκόζης (Siesjo, 1978). Η παρατεταμένη ισχαιμία οδηγεί σε σημαντικές αλλοιώσεις σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο, οι οποίες είναι μη αναστρέψιμες και έχουν ως συνέπεια τη βλάβη και τη νέκρωση του ιστού.

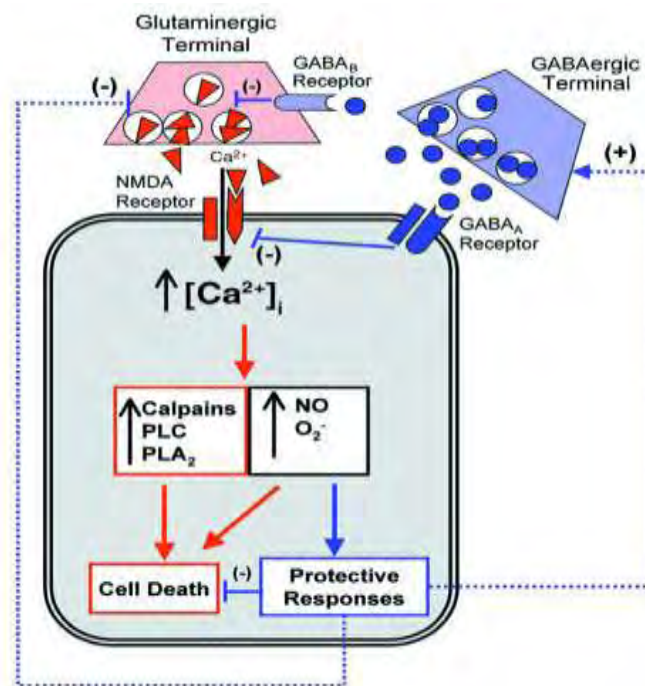
Οι διάφορες περιοχές του εγκεφάλου εμφανίζουν διαφορετική ευαισθησία στην ισχαιμία. Ο ιππόκαμπος είναι ένα κλασικό παράδειγμα επιλεκτικής ευαισθησίας στην

ισχαιμία. Το πεδίο CA1 του υποκάμπειου σχηματισμού είναι μία από τις πλέον ευαίσθητες περιοχές του εγκεφάλου στην ισχαιμία, ενώ οι παρακείμενες περιοχές CA3 και οδοντωτή έλικα είναι σχετικά ανθεκτικές (Schmidt-Kastner and Freund, 1991). Ευαίσθητοι είναι κυρίως οι πυραμιδικοί νευρώνες, ενώ οι περισσότεροι διάμεσοι νευρώνες είναι ανθεκτικοί, λόγω της διαφορετικής έκφρασης των NMDA υποδοχέων και/ή της σύστασης των υπομονάδων τους σε αυτούς (Avignone et al., 2005). Γενικά, η ευπάθεια στην ισχαιμία των υποπεριοχών του υποκάμπτου ακολουθεί την εξής σειρά: CA1, hilus > CA2 > CA3 > οδοντωτή έλικα (Schmidt-Kastner and Freund, 1991).

Σε συνθήκες ισχαιμίας, το γλουταμικό οξύ απελευθερώνεται μαζικά στη συναπτική σχισμή και αγγίζει συγκεντρώσεις οι οποίες είναι τοξικές για το νευρικό κύτταρο. Η απελευθέρωση του γλουταμικού οξέος ενεργοποιεί τους NMDA υποδοχείς, τους υποδοχείς AMPA και τους υποδοχείς καϊνικού. Η ενεργοποίηση των NMDA υποδοχέων έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη εισροή ιόντων ασβεστίου στο κύτταρο. Η αύξηση της συγκέντρωσης του ασβεστίου εντός του κυττάρου οδηγεί με τη σειρά της στην ενεργοποίηση της PKC και της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου με αποτέλεσμα την παραγωγή ελεύθερων ριζών μονοξειδίου του αζώτου. Η υπερδιέγερση των νευρικών κυττάρων, συνέπεια της μαζικής απελευθέρωσης γλουταμικού οξέος και ενεργοποίησης των NMDA υποδοχέων έχει σαν τελικό αποτέλεσμα των κυτταρικό θάνατο (Lee et al., 2000).

Ωστόσο, παρόλο που η ισχαιμία ενεργοποιεί ένα πλήθος κυτταροτοξικών μονοπατιών στον εγκέφαλο, ενεργοποιεί επίσης ενδογενείς προστατευτικούς μηχανισμούς προκειμένου να περιοριστεί η βλάβη. Ένας από αυτούς είναι η ενεργοποίηση των ενδονευρώνων. Η ενεργοποίηση των ενδονευρώνων έχει σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωση του GABA και την επακόλουθη μείωση της υπερδιεγερσιμότητας (εικόνα 22) (Lee et al., 2000).

Όπως αναφέραμε ήδη, κατά την ισχαιμία το GABA απελευθερώνεται στον εξωκυττάριο χώρο. Ωστόσο, κατά την ισχαιμία παρατηρείται αύξηση της συνολικής ποσότητας του GABA, τόσο ενδοκυτταρικά όσο και εξωκυτταρικά, σε ολόκληρο τον εγκέφαλο (Yamatsu et al., 1982). Αυτό πιθανώς οφείλεται σε αποτυχία του συστήματος αποικοδόμησης του GABA, σε συνδυασμό με τη συνεχή δράση της GAD, η οποία παράγει συνεχώς GABA (Perry et al., 1981).



Εικόνα 22: Σχηματική απεικόνιση των μηχανισμών που εμπλέκονται στον επαγόμενο από την ισχαιμία κυτταρικό θάνατο (κόκκινο) και την ανάπτυξη ανοχής στην ισχαιμία (μπλε) (Lee et al., 2000).

1.9 Κατανομή GABA νευρώνων στη ραχιαία και κοιλιακή μοίρα του ιπποκάμπου

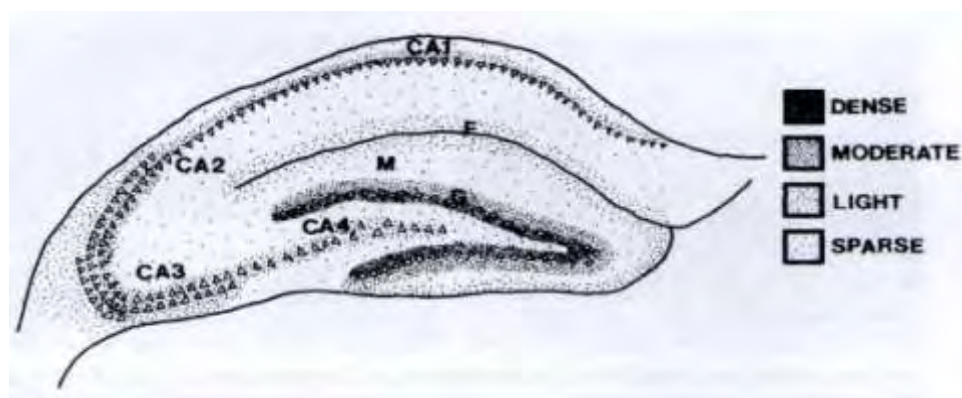
Ως GABAεργικοί αναφέρονται οι νευρώνες οι οποίοι συνθέτουν και χρησιμοποιούν GABA ως νευροδιαβιβαστή. Ανοσοϊστοχημικά αναγνωρίζονται λόγω της θετικής ανοσοδραστικότητάς τους είτε στη GAD (Freud et al., 1983; Kosaka et al., 1985; Ribak et al., 1978; Somogyi et al., 1983), είτε στο GABA (Garmani et al., 1986; Ottersen et al., 1984; Sloviter et al., 1987; Somogyi et al., 1984). Ο συνεντοπισμός της GAD67 και του GABA σε υψηλό ποσοστό (92.8%) σε νευρώνες του ιπποκάμπου, με μικρές μόνο διαφοροποιήσεις σε ορισμένες περιοχές της δομής, καθιστά τα δύο αυτά μόρια καλούς δείκτες σήμανσης GABAεργικών νευρώνων (Somogyi et al., 1984; Jinno et al., 1998). Επίσης, μέθοδοι *in situ* υβριδισμού, οι οποίες επιτρέπουν την σαφή απεικόνιση των νευρωνικών κυτταρικών σωμάτων, έχουν χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση των GABAεργικών νευρώνων (Houser and Esclapez, 1994).

Εκτεταμένες μελέτες, των τελευταίων δεκαετιών, καταδεικνύουν τον σημαντικό ρόλο των GABAεργικών νευρώνων σε λειτουργίες του ιπποκάμπου. Συγκεκριμένα, μελέτες ανατομίας, νευροχημείας, συναπτικής πλαστικότητας και συμπεριφοράς υποστηρίζουν την ύπαρξη διαφοροποίησης μεταξύ της ραχιαίας και της κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου. Επομένως, κρίνεται απαραίτητος ο ακριβής προσδιορισμός της τοπογραφικής κατανομής των GABAεργικών νευρώνων στις στιβάδες του ιπποκάμπου τόσο της ραχιαίας όσο και της κοιλιακής μοίρας αυτού.

Από τη δεκαετία του '80 που άρχισε να εξελίσσεται η τεχνική της ανοσοϊστοχημείας, με την παραγωγή αντισωμάτων για μικρά μόρια όπως το γλουταμικό οξύ, η ντοπαμίνη και το GABA (Anderson et al., 1986) έως και σήμερα έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες οι οποίες είχαν σαν στόχο τον ακριβή προσδιορισμό της κατανομής των GABAεργικών νευρώνων καθώς και των υποπληθυσμών αυτών στον ιπποκάμπο. Οι περισσότερες από αυτές αφορούν τον ιπποκάμπο του αρουραίου, ενώ τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται εκτενώς ο ιπποκάμπος του ποντικού (Jinno et al., 1998). Τα πρότυπα κατανομής των GABAεργικών νευρώνων στον ιπποκάμπο του ποντικού, σε αποτελέσματα μελετών που έχουν ως τώρα δημοσιευτεί, είναι παρόμοια με τα αποτελέσματα που είχαν

προηγουμένως δημοσιευτεί για τον ιππόκαμπο του αρουραίου (Woodson et al., 1989; Houser and Escalpez, 1994; Jinno et al., 2006).

Σύμφωνα με δημοσιευμένες μελέτες οι GABAεργικοί νευρώνες αποτελούν το 11% των νευρώνων του ιπποκάμπου (Woodson et al., 1989) και απαντώνται σε όλες τις στιβάδες τόσο της ραχιαίας όσο και της κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου (Somogyi et al., 1984; Jinno et al., 1998). Μεγαλύτερος αριθμός GABAεργικών νευρώνων βρέθηκε στην οδοντωτή έλικα, σε σχέση με τον κυρίως ιππόκαμπο (Hortnagl et al., 1991), με σαφή υπεροχή της κοιλιακής σε σχέση με τη ραχιαία μοίρα (Jinno et al., 1998). Στην οδοντωτή έλικα, η μεγαλύτερη πυκνότητα των GABAεργικών κυττάρων παρατηρείται στην κοκκώδη στιβάδα, με μικρότερη πυκνότητα στη μοριώδη στιβάδα και ελάχιστη στην πολυμορφική στιβάδα (hilus) (εικόνα 23) (Garmani et al., 1986; Anderson et al., 1986; Woodson et al., 1989 ; Jinno et al., 1998). Η μεγαλύτερη πυκνότητα GABAεργικών νευρώνων στην CA1 περιοχή παρατηρείται στην πυραμιδική στιβάδα, τόσο του ραχιαίου όσο και του κοιλιακού ιπποκάμπου χωρίς ωστόσο να υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ αυτών των δύο μοιρών. Στην CA3 περιοχή ο μεγαλύτερος αριθμός GABAεργικών νευρώνων απαντάται επίσης στην πυραμιδική καθώς και στην διαφανή στιβάδα. Σε αντίθεση με τη CA1 περιοχή, στην CA3 περιοχή υπάρχει σαφής υπεροχή του αριθμού των GABAεργικών νευρώνων στην κοιλιακή μοίρα σε σχέση με την ραχιαία μοίρα (Somogyi et al., 1984; Jinno et al., 1998).



Εικόνα 23: Σχηματική αναπαράσταση της πυκνότητας και της κατανομής των GABAεργικών νευρώνων στον ιππόκαμπο. Η μεγαλύτερη πυκνότητα παρατηρείται στο εσωτερικό 1/3 της κοκκώδους στιβάδας (G). Απεικονίζονται επίσης οι CA1 και CA3 περιοχές. Η πολύμορφη και κοκκώδης στιβάδα της οδοντωτής έλικας διαχωρίζονται από τον κυρίως ιππόκαμπο από την ιπποκάμπεια σχισμή (F). (Anderson et al., 1986).

Συνολικά, παρά τις διαφορές στις επιμέρους περιοχές του ιπποκάμπου, η αριθμητική πυκνότητα των GABAεργικών κυττάρων στον κροταφικό ιππόκαμπο φαίνεται να είναι υψηλότερη σε σχέση με τον διαφραγματικό (πίνακας 3) (Hortnagl et al., 1991; Jinno et al., 1998).

Subdivision	Dorsal	Ventral
CA1	7.0 ± 0.3	8.3 ± 0.9
CA3	5.7 ± 0.7	7.1 ± 0.7
DG	4.0 ± 0.4	6.5 ± 0.2
Total	5.7 ± 0.2	7.3 ± 0.3

Πίνακας 3: Αριθμητικές πυκνότητες GAD67 ανοσοδραστικών νευρώνων στις δύο μοίρες του ιπποκάμπου (τροποποιημένο από Jinno et al., 1998).

Τα τελευταία χρόνια, οι περισσότερες μελέτες έχουν εστιασθεί στον χαρακτηρισμό των διάφορων υποπληθυσμών των GABAεργικών νευρώνων και της ποσοτικής κατανομής τους στον ιππόκαμπο. Οι κύριοι υποπληθυσμοί των GABAεργικών νευρώνων χωρίζονται κυρίως με βάση την ασβεστιο-δεσμευτική πρωτεΐνη, το νευροπεπτίδιο ή το ένζυμο το οποίο φέρουν. Οι νευροχημικοί αυτοί δείκτες έχουν χρησιμοποιηθεί όχι μόνο στη διερεύνηση της ανατομικής οργάνωσης του εγκεφάλου, αλλά και στην εκτίμηση πιθανών αλλαγών σε παθολογικές καταστάσεις όπως η ισχαιμία (Arabadzisz et al., 1999) και η επιληψία (Cobos et al., 2005). Οι πιο βασικοί νευροχημικοί δείκτες που έχουν μελετηθεί είναι η παρβαλβουμίνη (PV), η καλρετινίνη (CR), η καλβιδίνη D28K (CB), η σωματοστατίνη (SOM), η χολοκυστοκινίνη (CCK), το αγγειοδραστικό εντερικό νευροπεπτίδιο (VIP), το νευροπεπτίδιο Υ (NPY) καθώς και η συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (NOS) (Nomura et al., 1997; Jinno et al., 1999 ; Jinno et al., 2002; Jinno et al., 2003).

1.9.1 GABAεργικοί νευρώνες και ασβεστιο-δεσμευτικές πρωτεΐνες

Οι GABAεργικοί νευρώνες που φέρουν παρβαλβουμίνη, καλρετινίνη, καλβιδίνη, θεωρείται ότι αποτελούν τρεις ευδιάκριτους υποπληθυσμούς

GABAεργικών νευρώνων καθώς συνεντόπιση στον ίδιο νευρώνα παρατηρείται σπάνια (Freund and Buzaki, 1996; Jinno et al., 2002). Το συνολικό ποσοστό των GABAεργικών νευρώνων που περιέχουν ασβεστιο-δεσμευτικές πρωτεΐνες αντιπροσωπεύει περίπου το 50% των GABAεργικών νευρώνων σε ολόκληρο τον ιππόκαμπο (45% στον ραχιαίο και 47% στο κοιλιακό).

A) Νευρώνες ανοσοδραστικοί στην παρβαλβουμίνη (PV-IR neurons)

Οι νευρώνες αυτοί αποτελούν το 17-20% των GABAεργικών νευρώνων στον ιππόκαμπο (Kosaka et al., 1987; Jinno et al., 2002). Οι περισσότεροι από τους μισούς (49-66%) εντοπίζονται στις κύριες κυτταρικές στιβάδες (πυραμιδική και κοκκώδης στιβάδα) τόσο της CA1 και CA3 όσο και της οδοντωτής έλικας. Η αριθμητική τους πυκνότητα είναι παρόμοια μεταξύ της CA1 και CA3 περιοχής και διπλάσια σε σχέση με αυτή στην οδοντωτή έλικα, τόσο στο ραχιαίο όσο και στον κοιλιακό ιππόκαμπο. Συνολικά, μεταξύ ραχιαίου και κοιλιακού ιπποκάμπου δεν παρατηρείται διαφορά του αριθμού των GABAεργικών νευρώνων που είναι θετικοί στην παρβαλβουμίνη (Nomura et al., 1997; Jinno et al., 2002).

B) Νευρώνες ανοσοδραστικοί στην καλρετινίνη (CR-IR neurons)

Αποτελούν το 9-12% των GABAεργικών νευρώνων στον ιππόκαμπο (Miettinen et al., 1992; Jinno et al., 2002). Το 44-56% αυτών εντοπίζεται στην πυραμιδική στιβάδα του Αμμόνιου κέρατος και το 41-48% στην κοκκώδη στιβάδα της οδοντωτής έλικας. Η πυκνότητα των ανοσοδραστικών στην καλρετινίνη νευρώνων αυξάνει καθώς προχωράμε από την ραχιαία προς την κοιλιακή μοίρα του ιπποκάμπου (Nomura et al., 1997 ; Jinno et al., 2002).

Γ) Νευρώνες ανοσοδραστικοί στην καλβιδίνη (CB-IR neurons)

Αποτελούν το 16% των GABAεργικών νευρώνων στον ιππόκαμπο (Freund and Buzaki, 1996 ; Jinno et al., 2002). Εντοπίζονται κυρίως στην πολύμορφη στιβάδα της CA1 και CA3 περιοχής και στην πολύμορφη στιβάδα της οδοντωτής έλικας. Έχουν παρατηρηθεί σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα στον ραχιαίο σε σχέση με τον κοιλιακό ιππόκαμπο (Nomura et al., 1997; Jinno et al., 2002).

1.9.2 GABAεργικοί νευρώνες και νευροπεπτίδια

Τα νευροπεπτίδια είναι ευρέως διαδεδομένα στο ΚΝΣ και θεωρείται ότι παίζουν σημαντικούς ρόλους στην ρύθμιση της νευρωνικής δραστηριότητας. Δρούν είτε σαν νευροδιαβιβαστές είτε σαν νευροτροποποιητές. Δεν αποκλείεται η συμμετοχή τους στην τροποποίηση της διεγερσιμότητας των νευρώνων του ιπποκάμπου (Jinno et al., 2003).

A) Νευρώνες ανοσοδραστικοί στο νευροπεπτίδιο Y (NPY-IR neurons)

Αποτελούν το 31% των GABAεργικών νευρώνων. Εντοπίζονται κυρίως στην στιβάδα των πολύμορφων κυττάρων καθώς και στην πυραμιδική στιβάδα στη CA1 και CA3 περιοχή καθώς και στην πολύμορφη στιβάδα της οδοντωτής έλικας. Σε ολόκληρο τον ιππόκαμπο δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ ραχιαίας και κοιλιακής μοίρας (Nomura et al., 1997; Jinno et al., 2003).

B) Νευρώνες ανοσοδραστικοί στη σωματοστατίνη (SOM-IR neurons)

Αποτελούν το 17% των GABAεργικών νευρώνων στον ιππόκαμπο. Στο 7% αυτών βρέθηκε να εντοπίζεται ταυτόχρονα και το ένζυμο συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (NOS). Το 90% αυτών εντοπίζονται στη στιβάδα των πολυμορφικών κυττάρων της CA1 και CA3 περιοχής. Σε μικρότερο ποσοστό απαντώνται στην πυραμιδική στιβάδα της CA1 και CA3 περιοχής καθώς και στην πολύμορφη στιβάδα της οδοντωτής έλικας. Μεταξύ ραχιαίας και κοιλιακής μοίρας υψηλότερα ποσοστά παρατηρήθηκαν στην κοιλιακή μοίρα (Kosaka et al., 1988; Jinno et al., 2003).

Στον ιππόκαμπο η σωματοστατίνη θεωρείται συμμεταβιβαστής των GABAεργικών νευρώνων (Freud and Buzaki, 1996). Έχει αναφερθεί ότι η σωματοστατίνη προκαλεί μείωση της βασικής απελευθέρωσης του GABA μέσω ενεργοποίησης των προσυναπτικών υποδοχέων της σωματοστατίνης (Nyitrai et al., 2003). Επειδή στη συντριπτική πλειοψηφία του οι ανοσοδραστικοί για σωματοστατίνη νευρώνες συνάπτονται με δενδρίτες πυραμιδικών κυττάρων, πιθανώς να ρυθμίζουν τη δραστηριότητά τους μέσω της απελευθέρωσης σωματοστατίνης (Jinno et al., 2004).

Γ) Νευρώνες ανοσοδραστικοί στη χολοκυστοκινίνη (CCK-IR neurons)

Αποτελούν το 7% των GABAεργικών νευρώνων στον ιππόκαμπο. Απαντώνται σχεδόν σε όλες τις στιβάδες της CA1 και της CA3 περιοχής με εξαίρεση τη βοθριώδη-μοριώδη στιβάδα της CA3 περιοχής. Στην οδοντωτή έλικα έχουν παρατηρηθεί ελάχιστοι έως καθόλου νευρώνες ανοσοδραστικοί στην χολοκυστοκινίνη. Μεταξύ ραχιαίας και κοιλιακής μοίρα δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά (Kosaka et al, 1985 ; Nomura et al, 1997 ; Jinno et al, 2003).

Δ) Νευρώνες ανοσοδραστικοί στο αγγειοδραστικό εντερικό νευροπεπτίδιο (VIP-IR neurons)

Αποτελούν το 8% των GABAεργικών νευρώνων. Απαντώνται επίσης σε όλες τις στιβάδες της CA1 και CA3 καθώς και της οδοντωτής έλικας. Υπεροχή της ραχιαίας σε σχέση με την κοιλιακή μοίρα παρατηρείται επίσης και εδώ (Kosaka et al., 1985; Jinno et al., 2003)

1.9.3 GABAεργικοί νευρώνες και συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (NOS-IR neurons)

Το μονοξείδιο του αζώτου (NO) είναι ένα ελεύθερα διαχεόμενο αέριο. Στον ιππόκαμπο, πολλές ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες έχουν ενοχοποιήσει το μονοξείδιο του αζώτου για την επαγωγή της μακροπρόθεσμης ενδυνάμωσης (long-term potentiation) και το σχηματισμό της μνήμης (Haley et al., 1992 ; Bohme et al., 1993), ενώ, κατά άλλους ερευνητές, ο ρόλος του στη συναπτική πλαστικότητα παραμένει ακόμα αμφιλεγόμενος (Holscher et al., 1997). Από την άλλη μεριά, σύμφωνα με μελέτη ένας από τους πιθανούς ρόλους του μονοξειδίου του αζώτου που απελευθερώνεται από τους GABAεργικούς νευρώνες είναι να ρυθμίζει τη ροή του αίματος στον ιππόκαμπο (Montecot et al., 1998).

Νευρώνες ανοσοδραστικοί στη συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (NOS-IR neurons)

Οι νευρώνες αυτοί αποτελούν το 30% των GABAεργικών νευρώνων στον ιππόκαμπο. Το 50% περίπου αυτών εντοπίζεται στην οδοντωτή έλικα και κυρίως στην κοκκώδη στιβάδα αυτής, ενώ το 20% εντοπίζεται στον κυρίως ιππόκαμπο και

κυρίως στην βοθριώδη-μοριώδη στιβάδα του. Η αριθμητική πυκνότητα των νευρώνων αυτών συνολικά στον ιππόκαμπο φαίνεται να αυξάνει από τον ραχιαίο προς τον κοιλιακό ιππόκαμπο (Nomura et al., 1997, Jinno et al., 2006).

1.10 Μονιμοποίηση και ο ρόλος της

Η μονιμοποίηση είναι μια χημική διαδικασία που χρησιμοποιείται ευρέως στον τομέα της ιστολογίας, παθολογοανατομίας και κυτταρικής βιολογίας. Ο στόχος της μονιμοποίησης είναι η διατήρηση της δομής του ιστού από τα κύτταρα μέχρι την αρχιτεκτονική των οργανιδίων με όσο το δυνατόν μικρότερη απόκλιση από την ζωντανή μορφή.

Από τη στιγμή που ο ιστός απομακρύνεται από τον ζωντανό οργανισμό, ξεκινάει η διαδικασία της αυτόλυσής του. Κατά την αυτόλυση συμβαίνει ενζυματική πέψη του κυττάρου από τα ένζυμα του ιδίου κυττάρου. Τα μονιμοποιητικά προλαμβάνουν την αυτόλυση, καθώς αδρανοποιούν τα λυσοσωμικά ένζυμα και σταθεροποιούν τη λεπτή αρχιτεκτονική τόσο εντός του κυττάρου όσο και μεταξύ των κυττάρων.

Η μονιμοποίηση προλαμβάνει επίσης την προσβολή του δείγματος από βακτήρια και μύκητες. Επιπλέον, σταθεροποιεί τα κύτταρα και τους ιστούς (με τον σχηματισμό νέων δεσμών μεταξύ των μορίων τους) δίνοντας τους τη δυνατότητα να υποβληθούν σε περαιτέρω διαδικασίες καταπόνησης χωρίς αλλαγές στη δομή. Τα ζωντανά κύτταρα περιβάλλονται από μια εκλεκτικά διαπερατή μεμβράνη. Η μονιμοποίηση καταστρέφει αυτή τη μεμβράνη καθιστώντας την πιο διαπερατή σε μεγάλα μόρια τα οποία μπορούν να εισέλθουν και να εξέλθουν από το κύτταρο. Επιπλέον, με την μονιμοποίηση, το κυτταρόπλασμα μπορεί να αποκτήσει υφή γέλης (sol-gel transformation), η οποία αποτελεί ένα πρωτεϊνικό δίκτυο και το οποίο επιτρέπει την διείσδυση μεγάλων μορίων στο κύτταρο (Boenisch, 2001).

Για την πραγματοποίηση ανοσοϊστοχημικών μελετών, είναι πολύ σημαντικό να διατηρηθεί η μορφολογία των ιστών και των κυττάρων καθώς επίσης και οι αντιγονικές θέσεις να είναι προσβάσιμες. Συνεπώς, η πραγματοποίηση ανοσοϊστοχημικής μελέτης σε ζωντανό ιστό είναι αδύνατη, καθώς όταν οι υπό μελέτη πρωτεΐνες ή δομές εντοπίζονται εντός των κυττάρων, τα αντισώματα πρέπει να εγχυθούν εντός αυτών. Παρόμοιες δυσκολίες συναντώνται, όταν η υπό μελέτη πρωτεΐνη ή δομή εντοπίζεται εντός κάποιου οργανιδίου του κυττάρου. Εξίσου δύσκολη είναι η πρόσδεση των αντισωμάτων σε δομές οι οποίες εντοπίζονται στην εξωτερική επιφάνεια του κυττάρου, λόγω του κινδύνου ενδοκυττάρωσης του συμπλέγματος αντισώματος-αντιγόνου κατά τη διάρκεια επώασης και της μη-ειδικής

πρόσδεσης των αντισωμάτων στην κυτταρική μεμβράνη. Συνεπώς, πολλά εργαστήρια χρησιμοποιούν τη χημική μονιμοποίηση των κυττάρων πριν την εφαρμογή των αντισωμάτων, ώστε να εξασφαλιστεί η σταθερή δομή πριν την εφαρμογή των αντισωμάτων στα κύτταρα (Javois, 1999).

Υπό ιδανικές συνθήκες η μονιμοποίηση ενός ιστού στοχεύει στη διατήρηση της αρχιτεκτονικής του επιφέροντας ελάχιστες αλλαγές στην κυτταρική δομή και τη χημική του σύσταση. Όμως, η μονιμοποίηση μπορεί να οδηγήσει στην διαστρέβλωση της υπό μελέτη δομής δηλαδή την κάλυψη του υπό μελέτη επιτόπου (epitope masking; Carson, 2009). Οι μέθοδοι μονιμοποίησης που επηρεάζουν σε μικρό βαθμό τη μορφολογία του επιτόπου, δεν διατηρούν επαρκώς τη μορφολογία του ιστού ενώ, αντιστρόφως, οι μονιμοποιητικές μέθοδοι που διατηρούν πιστά την αρχιτεκτονική του ιστού, διαστρεβλώνουν σε μεγαλύτερο βαθμό τους επιτόπους. Συνεπώς, δεν υπάρχει ένα ιδανικό μονιμοποιητικό για όλους τους ιστούς και για κάθε μελέτη. Έτσι, ανάλογα με τον ιστό και την υπό μελέτη περιοχή πρέπει να επιλέγεται η κατάλληλη τεχνική μονιμοποίησης (Lavenex et al., 2009).

1.11 Τρόποι μονιμοποίησης

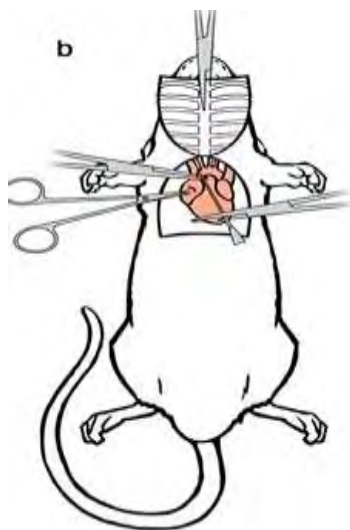
Υπάρχουν διάφοροι μέθοδοι μονιμοποίησης των ιστών. Οι πιο κοινές και συχνά χρησιμοποιούμενες είναι η μονιμοποίηση μέσω της κυκλοφορίας του αίματος (perfusion fixation) και η μονιμοποίηση μέσω εμβύθισης (immersion fixation).

1.11.1 Perfusion Fixation

Transcardial Perfusion

Σε αυτή την περίπτωση, το μονιμοποιητικό μέσο κατανέμεται συστηματικά μέσω του καρδιαγγειακού συστήματος του ζώου. Το ζώο αναισθητοποιείται και ενώ είναι ακόμη ζωντανό γίνεται διάνοιξη του θωρακικού τοιχώματος και έκθεση της παλλόμενης καρδιάς. Μια μη-τραυματική βελόνα τοποθετείται στην αριστερή κοιλία μέχρι την ανιούσα αορτή και πραγματοποιείται τομή στο δεξιό κόλπο (εικόνα 24) για την απορροή του αίματος. Το μονιμοποιητικό διαχέεται μέσω της αριστερής κοιλίας στη συστηματική κυκλοφορία καθώς η καρδιά εξακολουθεί να λειτουργεί ως αντλία. Έτσι, ενώ το πειραματόζωο είναι ακόμη ζωντανό, γίνεται μονιμοποίηση αυτού μέσω του ανέπαφου αγγειακού συστήματος (Gage et al., 2012). Στη συνέχεια, εξάγεται ο

εγκέφαλος από το κρανίο και εμβυθίζεται στο μονιμοποιητικό διάλυμα για να ολοκληρωθεί η μονιμοποίησή του.



Εικόνα 24:

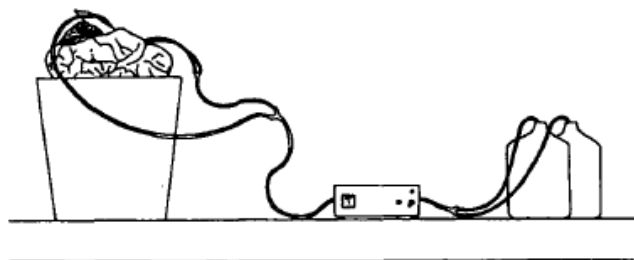
Προετοιμασία του πειραματοζώου για μονιμοποίηση με transcardial perfusion. Τοποθετείται μη-τραυματική βελόνα στην αριστερή κοιλία η οποία φτάνει μέχρι την ανιούσα αορτή και πραγματοποιείται τομή στον δεξιό κόλπο. (Gage et al., 2012).

Στο perfusion το μονιμοποιητικό διάλυμα διαχέεται σταδιακά από τα αιμοφόρα αγγεία στο γύρω παρέγχυμα. Η διάχυση του μονιμοποιητικού εξαρτάται από το βαθμό αγγείωσης της περιοχής που μελετάται, από το τοίχωμα του αγγείου και το ενδοθήλιο των αγγείων. Η μονιμοποίηση με perfusion αποτελεί μέχρι σήμερα τη μέθοδο εκλογής για το νευρικό σύστημα, καθώς ελαχιστοποιεί την περίοδο ανοξίας του ιστού και διατηρεί τη μορφολογία του εγκεφάλου (Lavenex et al., 2009). Επιπλέον, προκύπτει ότι για τη μελέτη κάποιων αντιγόνων, τα οποία εντοπίζονται στις πιο εσωτερικές περιοχές του ιστού, η τεχνική του perfusion είναι προτιμότερη, καθώς η ένταση της χρώσης κατά την ανοσοϊστοχημεία εξαρτάται από το βάθος στο οποίο φτάνει η μονιμοποίηση στον ιστό (Beach et al., 1987). Ωστόσο, η διαδικασία της μονιμοποίησης με perfusion είναι χρονοβόρα και δαπανηρή, διότι χρειάζονται μεγάλες ποσότητες μονιμοποιητικού διαλύματος ενώ, το αποτέλεσμα εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την εξοικείωση του προσωπικού με την τεχνική και την ανατομία του ζώου. Τέλος, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μονιμοποίηση ανθρώπινου ιστού.

Intravascular Perfusion Fixation

Στον ανθρώπινο εγκέφαλο περιγράφηκε μια παρόμοια τεχνική μονιμοποίησης. Σε αυτή την τεχνική ο εγκέφαλος απομακρύνεται από το κρανίο με προσοχή, ώστε να μην καταστραφούν τα αγγεία του εγκεφάλου, διατηρώντας ανέπαφο το εξάγωνο του Willis και το σπονδυλοβασικό σύστημα αρτηριών. Οι έσω καρωτίδες αποκόπτονται

και αφήνεται μόνο ένα μικρό τμήμα που προσφύεται στο εξάγωνο του Willis. Ο εγκέφαλος τοποθετείται ανάποδα πάνω σε πάγο (εικόνα 25) και καθετηριάζονται οι σπονδυλοβασικές αρτηρίες και οι έσω καρωτίδες. Ο εγκέφαλος αρχικά «ξεπλένεται» με αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα (phosphate buffered saline; PBS) και στη συνέχεια μονιμοποιείται με διάλυμα παραφορμαλδεΐδης 4% (paraformaldehyde; PFA). Στη συνέχεια, λαμβάνονται τομές εγκεφάλου και συνεχίζεται η μονιμοποίησή τους με την εμβύθισή τους (immersion) στο ίδιο μονιμοποιητικό διάλυμα (Beach et al., 1987).



Εικόνα 25: Προετοιμασία του εγκεφάλου για μονιμοποίηση με intravascular perfusion. Ο εγκέφαλος τοποθετείται ανάποδα πάνω σε πάγο και καθετηριάζονται οι σπονδυλοβασικές αρτηρίες και έσω καρωτίδες ώστε να εγχυθεί το μονιμοποιητικό μέσω των αρτηριών. (Beach et al., 1987).

1.11.2 Immersion Fixation

Κατά τη μονιμοποίηση μέσω εμβύθισης, ο ιστός που μας ενδιαφέρει βυθίζεται στο μονιμοποιητικό μέσο και η μονιμοποίηση πραγματοποιείται μέσω διάχυσης από την εξωτερική επιφάνεια του ιστού στο εσωτερικό του. Προκειμένου να επιτευχθεί μονιμοποίηση του ιστού, το μονιμοποιητικό πρέπει να κατανεμηθεί σε ολόκληρο το δείγμα σε όσο το δυνατό μικρότερο χρονικό διάστημα. Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη διείσδυση του μονιμοποιητικού μέσου στον ιστό είναι η θερμοκρασία, το pH και ο όγκος του μονιμοποιητικού, ο χρόνος έκθεσης στο μονιμοποιητικό, η πίεση και το μέγεθος της επιφάνειας του ιστού (Bancroft et al., 1996). Συνεπώς, τα χαρακτηριστικά του κάθε ιστού καθώς και οι χημικές ιδιότητες του μονιμοποιητικού μέσου που θα χρησιμοποιηθεί κάθε φορά, θα πρέπει να εξετάζονται προσεκτικά (Kasukurthi et al., 2009).

Επίσης, η μονιμοποίηση του ιστού είναι απαραίτητο να ξεκινήσει σε σύντομο χρονικό διάστημα από τη στιγμή της εκτομής του, καθώς η αυτόλυση του ιστού ξεκινάει άμεσα από τη στιγμή που διακόπτεται η κυκλοφορία του αίματος. Η καθυστέρηση της μονιμοποίησης έχει σαν αποτέλεσμα τη μη διατήρηση της μορφολογίας του ιστού και την καταστροφή του επιτόπου που μελετάται.

Μελέτες στο κεντρικό νευρικό σύστημα, έχουν δείξει ότι η μονιμοποίηση μέσω εμβύθισης μπορεί να δημιουργήσει προβληματικά artifacts στον υπό μελέτη εγκεφαλικό ιστό (Simmons et al., 1996; Kasukurthi et al., 2009). Ωστόσο, σε αντίθεση με το perfusion, η μονιμοποίηση μέσω εμβύθισης, είναι λιγότερο δαπανηρή και χρονοβόρα και επιπλέον δεν χρειάζεται ιδιαίτερη εξοικείωση του προσωπικού. Αξίζει να σημειωθεί, ότι στη μονιμοποίηση περιορισμένου όγκου ιστού, όπως στην περίπτωση των μονήρων περιφερικών νεύρων, η μέθοδος της μονιμοποίησης μέσω εμβύθισης αποτελεί μια εξίσου καλή εναλλακτική τεχνική μονιμοποίησης και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη νευροεκφυλιστικών παθήσεων των περιφερικών νεύρων (Kasukurthi et al., 2009).

1.12 Μονιμοποιητικά διαλύματα

Το ιδανικό μονιμοποιητικό διάλυμα θα πρέπει να διατηρεί την αντιγονικότητα του επιτόπου, χωρίς να αλλοιώνει σε μεγάλο βαθμό τη μορφολογία του ιστού. Υπάρχει μεγάλη ποικιλία μονιμοποιητικών διαλυμάτων και η επιλογή του κατάλληλου μονιμοποιητικού διαλύματος θα πρέπει να γίνεται ανάλογα με το αντιγόνο που μελετάται και το αντίσωμα που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί στη μετέπειτα ανοσοϊστοχημική μελέτη.

1.12.1 Φορμαλδεΰδη –Παραφορμαλδεΰδη

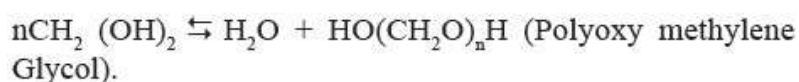
Ιστορικά στοιχεία

Η φορμαλδεΰδη ανακαλύφθηκε το 1859 από τον Butlerov, αλλά οι ιδιότητες της άρχισαν να μελετώνται το 1868 από τον Van Hoffman στο πλαίσιο του ακαδημαϊκού του έργου. Στη συνέχεια, ο Ferdinand Blum μελέτησε τη βακτηριοκτόνο δράση της φορμαλδεΰδης ενάντια στα *Bacillus anthracis*, *B. typhi*, *S. aureus* και *Proteus sp* (Blum, 1893). Στην επόμενη μελέτη του, η οποία σχετιζόταν με την απολύμανση, ανακάλυψε τυχαία τη μονιμοποιητική ιδιότητα της φορμαλδεΰδης. Παρατήρησε ότι το δέρμα των δάκτυλων του, το οποίο είχε κατά λάθος έρθει σε επαφή με το διάλυμα, είχε σκληρύνει και παρατήρησε ότι είχε την ίδια σύσταση με τους ιστούς μονιμοποιημένους σε αλκοόλη ή σε άλλα μονιμοποιητικά υλικά (Blum, 1893). Οι χρώσεις με εοσίνη και αιματοξυλίνη στα δείγματα ιστών που

είχαν μονιμοποιηθεί με φορμαλδεΰδη, ήταν άριστες και παρατηρήθηκε ότι η φορμαλδεΰδη οδηγούσε σε μικρότερη συρρίκνωση και παραμόρφωση του ιστού από ότι η αλκοόλη.

Βιοχημικά στοιχεία

Η φορμαλδεΰδη είναι ένα άχρωμο αέριο, διαλυτό στο νερό. Η φορμαλδεΰδη συναντάται στη φορμαλίνη και στην παραφορμαλδεΰδη. Στο εμπόριο τα διαλύματα φορμαλίνης περιέχουν 37-40% w/w διαλυτού αερίου φορμαλδεΰδης. Σε αυτά προστίθεται φορμικό οξύ (<0,05%) και 10-15% μεθανόλης για να εμποδιστεί ο πολυμερισμός της φορμαλδεΰδης σε παραφορμαλδεΰδη. Η φορμαλδεΰδη στα υδατικά διαλύματα μετατρέπεται σε μια ενυδατωμένη μορφή και σχηματίζει μια γλυκόλη (glycol/methylene glycol). Όταν οι γλυκόλες αντιδράσουν μεταξύ τους πολυμερίζονται και σχηματίζουν ένα πολυμερές (Polyoxy methylene glycol) (εικόνα 26).



Εικόνα 26: Αντίδραση παραγωγής της μεθυλο-γλυκόλης (ενυδάτωση φορμαλδεΰδης), αντίδραση πολυμερισμού της μεθυλο-γλυκόλης (Thavarajah et al., 2012).

Σε ένα ιδανικό διάλυμα φορμαλδεΰδης, η ισορροπία μεταξύ της πολυμερισμένης και της απο-πολυμερισμένης μορφής πρέπει να ρέπει προς την πλευρά της απο-πολυμερισμένης μορφής (γλυκόλη), η οποία έχει την ιδιότητα να διεισδύει γρήγορα στους ιστούς. Παρακάτω φαίνεται σχηματικά η ενυδάτωση της φορμαλδεΰδης, η δημιουργία των πολυμερισμένων άνυδρων μορφών φορμαλδεΰδης και ο αποπολυμερισμός αυτών (εικόνα 27) (Thavarajah et al., 2012).



Εικόνα 27. Σχηματική παρουσίαση του πολυμερισμού και απο-πολυμερισμού τη φορμαλδεΰδης (Thavarajah et al., 2012).

Γιατί προτιμάται η παραφορμαλδεΐδη;

Η παραφορμαλδεΐδη βρίσκεται σε μορφή σκόνης και είναι μια πολυμερισμένη μορφή φορμαλδεΐδης, η οποία απο-πολυμερίζεται στους 60° C και σε ρυθμιστικό διάλυμα με pH 7,2-7,6 (Εικόνα 11). Ένα διάλυμα φορμαλδεΐδης 4% παρασκευασμένο από φορμαλίνη περιέχει περίπου 1% μεθανόλη. Επίσης, περιέχει μικρή ποσότητα φορμικού οξέως. Αυτά προέρχονται από την αντίδραση Cannizzaro, στην οποία δύο μόρια φορμαλδεΐδης αντιδρούν μεταξύ τους και το ένα μετατρέπεται σε μεθανόλη και το άλλο σε φορμικό οξύ. Λόγω της βραδύτητας της αντίδρασης, η συγκέντρωση της μεθανόλης και του φορμικού οξέος στο διάλυμα φορμαλδεΐδης αυξάνει σταδιακά. Το διάλυμα φορμαλδεΐδης, το οποίο χρησιμοποιείται στη μονιμοποίηση ιστών για ερευνητικούς σκοπούς, προκύπτει από διάλυμα παραφορμαλδεΐδης το οποίο δεν περιέχει μεθανόλη, φορμικό οξύ ή υπολείμματα επιπρόσθετων αλδεϋδών και κετονών.

Το φορμικό οξύ είναι ο πιο κοινός ρύπος στα εμπορικά σκευάσματα ή στα αποθηκευμένα διαλύματα φορμαλδεΐδης ο οποίος μειώνει το pH του μονιμοποιητικού διαλύματος. Η καλύτερη λύση για τη διατήρηση του pH (7,2-7,4) είναι η παρασκευή του μονιμοποιητικού διαλύματος από παραφορμαλδεΐδη με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος. Φαίνεται ότι η περιεκτικότητα είναι μικρή στο φρέσκο διάλυμα παραφορμαλδεΐδης 4%, ενώ όσο παλιώνει το διάλυμα αυξάνεται η περιεκτικότητα σε φορμικό οξύ (Fox, 1985).

1.13 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η ακριβής εκτίμηση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του γ-αμινοβουτυρικού οξέος στη ραχιαία και κοιλιακή μοίρα του ιπποκάμπου απαιτεί μία τεχνική μονιμοποίησης, που να διατηρεί τη μορφολογία του ιστού με όσο το δυνατόν μικρότερη απόκλιση από τη ζωντανή μορφή, καθώς έχει αναφερθεί ότι νεκρωτικά στοιχεία στον ιστό μπορεί να δημιουργήσουν artifacts λόγω μη ειδικής σύνδεσής τους με συγκεκριμένα αντισώματα.

Η μονιμοποίηση μέσω της κυκλοφορίας του αίματος (perfusion) αποτελεί τη μέθοδο αναφοράς όσον αφορά την ανοσοϊστοχημική απεικόνιση. Ωστόσο, είναι μία μέθοδος χρονοβόρα, δαπανηρή, απαιτεί εξοικείωση του προσωπικού με την τεχνική και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη εγκεφαλικού ιστού ανθρώπου. Η μέθοδος μονιμοποίησης μέσω εμβύθισης, είναι σχετικά απλή και δεν απαιτεί ιδιαίτερη εξοικείωση του προσωπικού με την τεχνική. Επιπλέον, η επιτυχημένη λήψη του δείγματος εξασφαλίζει υγιή, ζωντανό ιστό από τον οποίο μπορεί ακόμη να πραγματοποιηθεί ηλεκτροφυσιολογική-λειτουργική μελέτη.

Τις τελευταίες δεκαετίες, γίνεται συνεχής προσπάθεια σύγκρισης των δύο βασικών τεχνικών μονιμοποίησης και τα συμπεράσματα που προκύπτουν είναι αντικρουόμενα. Ωστόσο, από τη βιβλιογραφία απουσιάζουν δεδομένα που αφορούν την έκφραση του GABA σε τομές ιπποκάμπου μονιμοποιημένες μέσω εμβύθισης.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να αποτυπώσει την ανοσοϊστοχημική έκφραση του GABA σε λεπτές τομές ιπποκάμπου, μονιμοποιημένες μέσω εμβύθισης. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήσαμε ανοσοϊστοχημική μελέτη με τη χρήση πολυκλωνικών αντισωμάτων έναντι του GABA με στόχο, τη μελέτη της κατανομής των GABA νευρώνων μεταξύ ραχιαίας και κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου, σε τομές ιπποκάμπου μονιμοποιημένες μέσω εμβύθισης.

Η σύγκριση έγινε με δεδομένα από το αρχείο του εργαστηρίου μας, όπου για τη μελέτη της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του GABA στον ιπποκάμπο, πραγματοποιήθηκε μονιμοποίηση με perfusion.

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.1.1 Πειραματόζωα

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί, νεαροί, λευκοί επίμυες Wistar βάρους 200-350g (εικόνα 28). Τα πειραματόζωα στεγάστηκαν ανά τρία μέσα σε κλωβούς σε χώρο με σταθερή θερμοκρασία $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ και εναλλαγή φωτός-σκότους κάθε 12 ώρες και είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό.



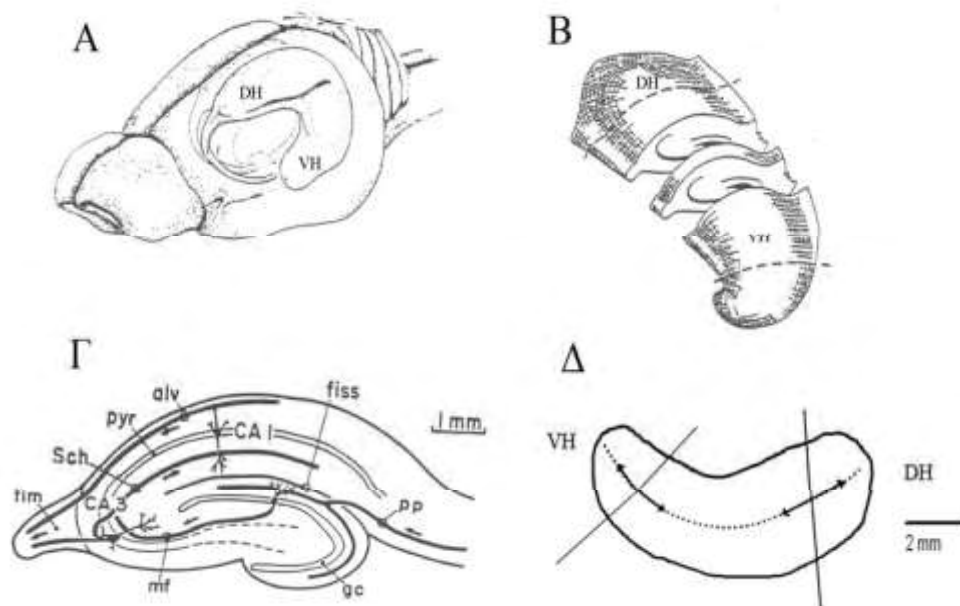
Εικόνα 28: Επίμυες Wistar (http://www.iar.or.jp/wi_rat).

Οι συνθήκες διαβίωσης και χειρισμού των αρουραίων ήταν σύμφωνες με τον Ελληνικό Νόμο (Π.Δ. 160/91).

2.1.2 Παρασκευή του ιστού

Για τη λήψη και τη μονιμοποίηση τομών υποκάμπου των πειραματόζωων, τα ζώα αναισθητοποιήθηκαν εισπνέοντας αιθέρα σε στεγανό θάλαμο και εν συνεχεία αποκεφαλίστηκαν σε λαιμητόμο. Πραγματοποιήθηκε άμεσα διάνοιξη του κρανίου και αφαίρεση του εγκεφάλου με λεπτούς χειρισμούς. Καθ'όλη τη διαδικασία ο εγκέφαλος διαβρεχόταν με ενστάλαξη κρύου (4°C) τεχνητού εγκεφαλονωτιαίου υγρού σύστασης (σε mM) 124 NaCl; 4 KCl; 2 MgSO_4 ; 2 CaCl_2 ; 1.25 NaH_2PO_4 ; 26 NaHCO_3 ; 10 γλυκόζη, pH 7.4, με συνεχή οξυγόνωση με μείγμα αερίου σύστασης 95% O_2 -5% CO_2 . Στη συνέχεια, ακολούθησε αποκοπή της παρεγκεφαλίδας, διαχωρισμός των δύο ημισφαιρίων με τομή κατά μήκος μεσαίας σχισμής και αποκόλληση του υποκάμπου από τις παρακείμενες δομές. Προκειμένου να μειωθεί ο χρόνος ισχαιμίας και να διασφαλισθεί η βιωσιμότητα του ιστού, χρησιμοποιήθηκε ο

ιππόκαμπος από το ένα μόνο ημισφαίριο. Ακολούθως, ο ιππόκαμπος τοποθετήθηκε στην έδρα μικροτόμου (McIlwain tissue chopper) και ελήφθησαν τομές πάχους 500μm εγκάρσιως ως προς τον επιμήκη άξονα του ιπποκάμπου, τόσο από τη ραχιαία όσο και από την κοιλιακή μοίρα (εικόνα 29). Κάθε τομή μεταφερόταν με πινέλο σε δοχείο που περιείχε μονιμοποιητικό διάλυμα παραφορμαλδεΰδης (4% PFA) σε 0.1M PB (0.1M NaH_2PO_4 και 0.1M Na_2HPO_4) με pH 7.4 στους 4° C. Οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν σε σύντομο χρονικό διάστημα περίπου πέντε λεπτών.



Εικόνα 29: (A) Σχηματική παράσταση της θέσης του ιπποκάμπου στον εγκέφαλο αρουραίου και (B) του τρόπου διαχωρισμού του σε εγκάρσιες τομές. Τα DH (dorsal hippocampus) και VH (ventral hippocampus) αντιστοιχούν στον ραχιαίο και τον κοιλιακό πόλο του ιπποκάμπου αντίστοιχα. (Γ) Απεικόνιση του βασικού κυκλώματος και των στιβάδων, όπως οργανώνονται σε μία εγκάρσια τομή ιπποκάμπου. (Δ) Σχηματική παράσταση των γονιών τομής του ιπποκάμπου στους δύο πόλους του (Διδακτορική διατριβή Θ.Πετρίδης, Πάτρα 2008).

Οι τομές παρέμειναν στο μονιμοποιητικό διάλυμα παραφορμαλδεΰδης στους 4°C για περίπου 24-48 ώρες. Μετά το πέρας αυτών των ωρών, πραγματοποιήθηκε έκπλυση του μονιμοποιητικού υλικού, υπό συνεχή παροχή τρεχούμενου νερού για ένα τέταρτο, και εν συνεχεία ο ιστός τοποθετήθηκε διαδοχικά σε διαλύματα αλκοόλης σταδιακά αυξημένης πυκνότητας (50°, 70°, 95°, 100°), για μισή ώρα σε έκαστο διάλυμα, με σκοπό την πλήρη αφυδάτωσή του. Αμέσως μετά ακολούθησε παραμονή των τομών σε δύο διαδοχικά καθαρά διαλύματα ξυλόλης, για μία ώρα σε έκαστο, ώστε να αντικατασταθεί το μέσο αφυδάτωσης από την ξυλόλη που αποτελεί συμβατό διαλύτη με το μέσο έγκλεισης (παραφίνη). Οι τομές εν συνεχεία, παρέμειναν

σε καθαρή παραφίνη, μέσα σε κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 60-62°C, για δύο ώρες σε δύο διαδοχικά δοχεία. Τέλος, οι τομές εγκλείστηκαν σε παραφίνη και διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι την τελική τους χρήση.

2.1.3 Επιλογή τομών για ανοσοφθορισμό

Από τα εγκλεισμένα σε παραφίνη παρασκευάσματα έγινε λήψη μετωπιαίων τομών πάχους 4μm σε βάθος 100-200μm περίπου από την επιφάνεια, όπου ο ιστός είναι μορφολογικά ανέπαφος, με χρήση μικροτόμου κοπής. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης, προκειμένου να εξασφαλιστεί μια αδρή χαρτογράφηση του κάθε παρασκευάσματος. Στόχος ήταν, η επιλογή τομών όπου ο ιστός αποτελούνταν από κύτταρα με διακριτό πυρήνα, χωρίς νεκρωτικά στοιχεία τα οποία πιθανώς να δημιουργούσαν artifacts στο επόμενο στάδιο της ανοσοϊστοχημείας. Με οδηγό αυτές τις εικόνες, έγινε λήψη συγκεκριμένων τομών, πάχους 4μm με σκοπό να πραγματοποιηθεί χρώση ανοσοφθορισμού.

2.1.4 Μελέτες ανοσοφθορισμού

Για τον εντοπισμό με χρώση ανοσοφθορισμού, της παρουσίας και ενεργότητας των GABA κυττάρων στον ιππόκαμπο, χρησιμοποιήθηκε:

- ως πρώτο αντίσωμα, πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του GABA, ανεπτυγμένο σε κουνέλι σε τελική συγκέντρωση 1:500 (Sigma Γερμανίας) και
- ως δεύτερο αντίσωμα, το συνδεδεμένο με φλουοροσκεΐνη φθορίζον αντίσωμα, ανεπτυγμένο σε αίγα έναντι των IgG (H+L) ανοσοσφαιρινών του κουνελιού σε τελική συγκέντρωση 1:100.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε αποπαραφίνωση των τομών, με παραμονή για 6 λεπτά σε θερμό (40°C) διάλυμα καθαρής ξυλόλης, και για ακόμα 6 λεπτά σε διάλυμα καθαρής ξυλόλης σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, ακολούθησε ενυδάτωση των τομών σε διαλύματα αλκοόλης σταδιακά μειούμενης πυκνότητας (100°, 96°, 80°, 70°, 50°), με παραμονή για 10 λεπτά στο διάλυμα με πυκνότητα 100° και για 5 λεπτά σε καθένα από τα υπόλοιπα. Μετά από δύο φορές έκπλυση, με διάλυμα PBS (0.1M NaH₂PO₄, 0.1M Na₂HPO₄ και 0.9% NaCl, pH 7.4), οι ιστοί μεταφέρθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος 0.01M σε pH 6, και θερμάνθηκαν σε φούρνο μικροκυμάτων προκειμένου να αποκαλυφθούν οι αντιγονικές θέσεις, οι οποίες

πιθανόν καλύφθηκαν κατά την αφυδάτωση (για 3 λεπτά στα 750Watt και για 7 λεπτά στη συνέχεια στα 350Watt). Οι ιστοί αφέθηκαν να επιστρέψουν σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθως, μετά από μία ακόμη έκπλυση με διάλυμα PBS, επώασθηκαν για 30 λεπτά σε διάλυμα ορού αίγας (10% NGS σε PBS), για την αποφυγή της μη ειδικής δέσμευσης των αντισωμάτων. Εν συνεχεία, ο ορός αφαιρέθηκε και οι τομές επώασθηκαν με το πρώτο αντίσωμα, το οποίο είχε προηγουμένως διαλυθεί σε διάλυμα PBS το οποίο περιείχε 0.5% Triton X, ώστε η τελική συγκέντρωση του αντισώματος να είναι 1:500. Η επώαση με το πρώτο αντίσωμα έγινε για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια για 16-18 ώρες σε θερμοκρασία συντήρησης (4°C) σε υγρό περιβάλλον.

Μετά την παραμονή τους για 16-18 ώρες σε θερμοκρασία συντήρησης (4°C), οι ιστοί αφέθηκαν για μία ώρα να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε έκπλυση με διάλυμα PBS και επώαση με το δεύτερο αντίσωμα για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από εκ νέου έκπλυση με διάλυμα PBS, οι τομές καλύφθηκαν με υλικό κάλυψης φθορισμού και παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού.

2.1.5 Μικροσκοπία και ανάλυση δεδομένων

Τα παρασκευάσματα των ανοσοϊστοχημικών μελετών παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss Axioskop, με φακό Plan-Neofluar x40/ 0.75. Η λήψη των φωτογραφιών έγινε με τη χρήση ασπρόμαυρης κάμερας AxioCam CCD (Carl Zeiss, Jena, Germany) συνδεδεμένης με ηλεκτρονικό υπολογιστή.

Για τη μελέτη της κατανομής των GABA νευρώνων στις δύο μοίρες του ιπποκάμπου, έγινε ανασύνθεση των εικόνων που λήφθηκαν, ώστε να είναι δυνατή η καταμέτρηση των θετικά βαμμένων νευρώνων σε κάθε υποπεριοχή του ιπποκάμπου, CA1, CA3 και οδοντωτή έλικα. Το όριο, μεταξύ της CA1 περιοχής και του υποθέματος αποτέλεσε το σημείο εκείνο όπου η πυραμιδική στιβάδα, αποτελούμενη από πυκνά τοποθετημένα σώματα πυραμιδικών κυττάρων, εξαφανίζεται. Το όριο μεταξύ της CA1 και της CA3 περιοχής, αποτέλεσε το σημείο όπου εμφανίζεται η διαφανής στιβάδα. Το όριο μεταξύ της CA3 περιοχής και της οδοντωτής έλικας, αποτέλεσε η νοητή γραμμή που ενώνει τα δύο άκρα της κοκκώδους στιβάδας της οδοντωτής έλικας. Δεν διαχωρίσαμε την CA2 περιοχή από την CA1 και CA3 περιοχή καθώς ήταν αρκετά δύσκολο να προσδιορίσουμε τα ακριβή όριά της. Στην κάθε υποπεριοχή, έγινε καταμέτρηση των θετικά βαμμένων νευρώνων, δηλαδή των

νευρώνων που είτε ήταν πλήρως βαμμένοι είτε είχαν μαύρο-άβαφο διακριτό πυρήνα και βαμμένο περικάρυο.

Για τον προσδιορισμό της έκφρασης του GABA στα κυτταρικά σώματα των ενδονευρώνων μετρήσαμε την ένταση της φωτεινότητας ανά εικονοστοιχείο. Συγκεκριμένα, με τη βοήθεια του προγράμματος ανάλυσης εικόνων ImageJ, έγινε καταγραφή της έντασης της φωτεινότητας στο κυτταρόπλασμα των θετικά βαμμένων GABA ενδονευρώνων, σε κάθε υποπεριοχή του ιπποκάμπου. Η μέτρηση έγινε τόσο σε εικόνες ιπποκάμπου όπου είχε προηγηθεί μονιμοποίηση μέσω εμβύθισης σε μονιμοποιητικό διάλυμα, όσο και σε εικόνες ιπποκάμπου όπου είχε προηγηθεί μονιμοποίηση μέσω της κυκλοφορίας του αίματος (αρχείο του Εργαστηρίου).

2.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.2.1 Γενικά

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 15 πειραματόζωα, από τα οποία τα 9 έφτασαν έως και το στάδιο της ανοσοϊστοχημείας. Αρχικά, μελετήσαμε την κατανομή των GABA νευρώνων σε τομές ιπποκάμπου μονιμοποιημένες μέσω εμβύθισης σε μονιμοποιητικό διάλυμα, τόσο της ραχιαίας όσο και της κοιλιακής μοίρας αυτού. Η καταμέτρηση των θετικά βαμμένων νευρώνων, δηλαδή των νευρώνων που ήταν πλήρως χρωσμένοι ή είχανε μαύρο-άβαφο διακριτό πυρήνα στο κέντρο και χρωσμένο περικάρυο, έγινε σε όλες τις στιβάδες των CA1 και CA3 υποπεριοχών του ιπποκάμπου καθώς και της οδοντωτής έλικας. Ο διαχωρισμός των υποπεριοχών έγινε με τον τρόπο που περιγράφεται παραπάνω.

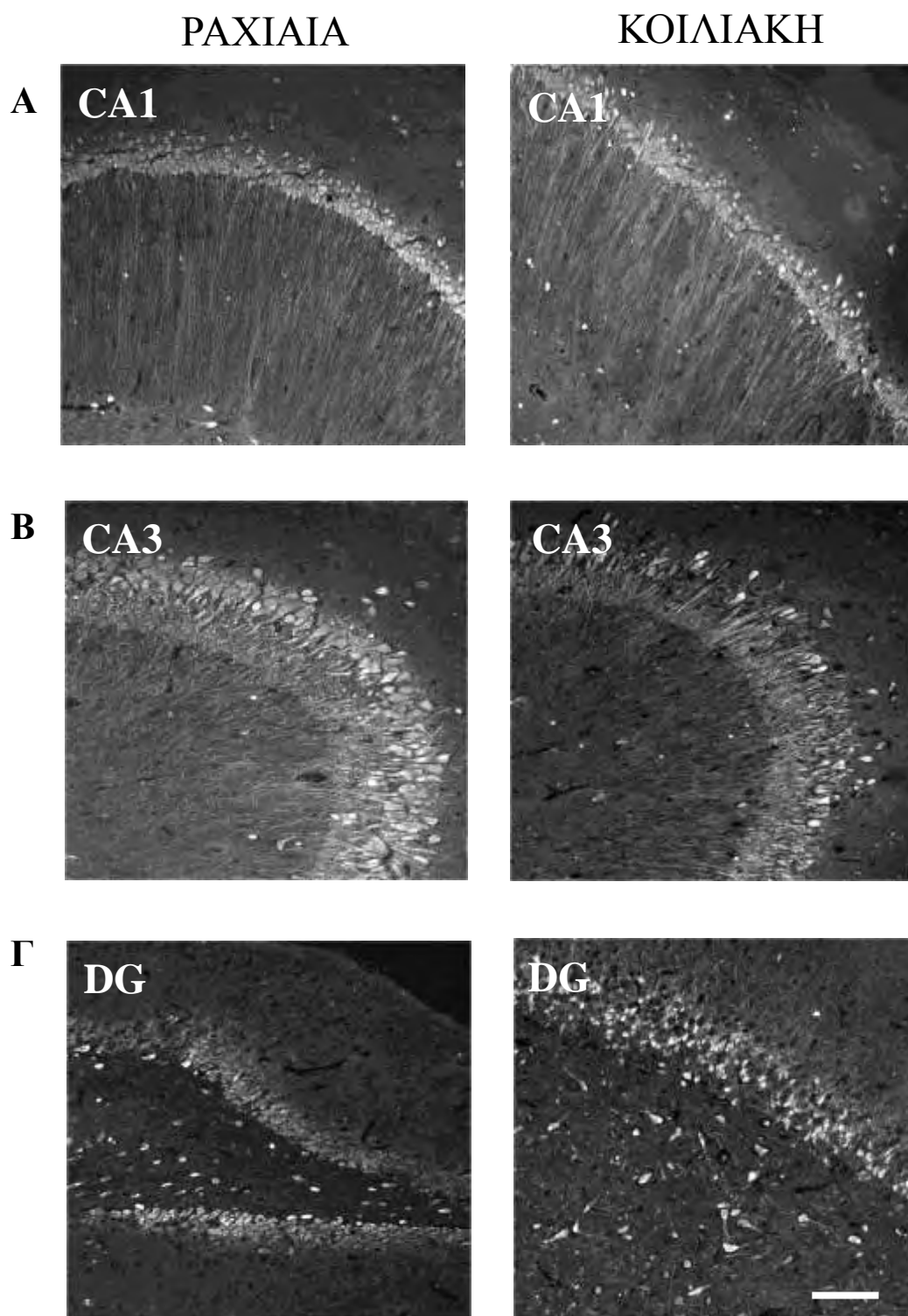
Στη συνέχεια, προκειμένου να μελετήσουμε εάν η ανοσοϊστοχημική έκφραση του GABA επηρεάζεται από την μέθοδο μονιμοποίησης, μετρήσαμε την ένταση της φωτεινότητας στο κυτταρόπλασμα των θετικά βαμμένων GABA νευρώνων σε τομές ιπποκάμπου μονιμοποιημένες μέσω εμβύθισης σε μονιμοποιητικό διάλυμα της παρούσας μελέτης και σε τομές ιπποκάμπου, από το αρχείο του εργαστηρίου μας, όπου είχε προηγηθεί μονιμοποίηση μέσω της κυκλοφορίας του αίματος.

2.2.2 Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός GABA νευρώνων

GABA ανοσοδραστικοί νευρώνες παρατηρήθηκαν σε όλες τις στιβάδες και σε όλες τις υποπεριοχές του ιπποκάμπου (εικόνα 30). Ο μεγαλύτερος αριθμός ενδονευρώνων παρατηρήθηκε στην οδοντωτή έλικα και ο μικρότερος αριθμός στην CA1 περιοχή, τόσο της ραχιαίας όσο και της κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου. Επίσης, παρατηρήθηκε μεγαλύτερος αριθμός GABA ενδονευρώνων στην κοιλιακή μοίρα του ιπποκάμπου, σε σχέση με τη ραχιαία μοίρα, σε όλες τις υποπεριοχές του ιπποκάμπου (πίνακας 4).

Υποπεριοχή	Ραχιαία μοίρα	Κοιλιακή μοίρα
CA1	14	25
CA3	28	31
Οδοντωτή έλικα	37	51
Σύνολο	79	107

Πίνακας 4: Αριθμός GABA θετικών νευρώνων στη CA1 και CA3 περιοχή καθώς και στην οδοντωτή έλικα της ραχιαίας και κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου.



Εικόνα 30: Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός του GABA στις υποπεριοχές της ραχιαίας και κοιλιακής μοίρας του υποκάμπου. **(Α)** CA1 περιοχή **(Β)** CA3 περιοχή **(Γ)**) οδοντωτή έλικα. Κλίμακα: 100 μm .

Γενικά, ο αριθμός των νευρώνων με θετική ανοσοδραστικότητα στο GABA (εικόνα 31), σε όλες τις στιβάδες ήταν μεγαλύτερος στη κοιλιακή μοίρα σε σχέση με τη ραχιαία μοίρα του ιπποκάμπου, σε όλες τις υποπεριοχές (πίνακας 5). Στις κύριες κυτταρικές στιβάδες (πυραμιδική στιβάδα της CA1 και CA3 περιοχής και κοκκώδης στιβάδα της οδοντωτής έλικας) παρατηρήθηκε μεγαλύτερος αριθμός GABA νευρώνων, σε σχέση με τις δενδριτικές στιβάδες (στιβάδα πολύμορφων κυττάρων, ακτινωτή στιβάδα, βοθριώδης-μοριώδης στιβάδα της CA1 και CA3 περιοχής και πολύμορφη στιβάδα και μοριώδης στιβάδα της οδοντωτής έλικας). Ο μεγαλύτερος αριθμός GABA νευρώνων παρατηρήθηκε στην κοκκώδη στιβάδα της οδοντωτής έλικας. Στην CA1 περιοχή, ο αριθμός των GABA νευρώνων στην πυραμιδική στιβάδα της κοιλιακής μοίρας, ήταν διπλάσιος σε σχέση με τον αριθμό των GABA νευρώνων στην πυραμιδική στιβάδα της ραχιαίας μοίρας. Στην CA3 περιοχή, ο αριθμός των GABA νευρώνων σε όλες τις στιβάδες δεν παρουσίασε ιδιαίτερες διαφορές ανάμεσα στις δύο μοίρες. Ωστόσο, η κοιλιακή μοίρα υπερέχει σε σχέση με τη ραχιαία μοίρα ως προς τον αριθμό των GABA νευρώνων. Στην οδοντωτή έλικα, ο μεγαλύτερος αριθμός GABA νευρώνων παρατηρήθηκε στην κοκκώδη στιβάδα και στην πύλη τόσο της κοιλιακής όσο και της ραχιαίας μοίρας, με την κοιλιακή μοίρα του ιπποκάμπου να υπερέχει έναντι της ραχιαίας μοίρας.

Στιβάδα	Ραχιαία μοίρα	Κοιλιακή μοίρα
CA1		
Πολύμορφων κυττάρων	4	6
Πυραμιδική	6	12
Ακτινωτή	3	5
Βοθριώδης-μοριώδης	1	2
Σύνολο	14	25
CA3		
Πολύμορφων κυττάρων	6	10
Πυραμιδική	15	17
Ακτινωτή	3	3
Βοθριώδης-μοριώδης	4	1
Σύνολο	28	31
Οδοντωτή έλικα		
Πύλη	12	18
Κοκκώδης	20	30
Μοριώδης	5	3
Σύνολο	37	51

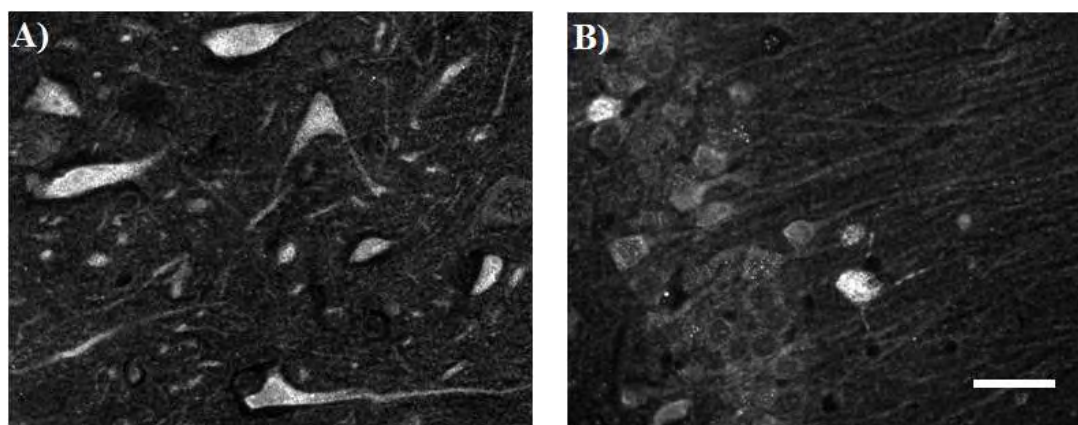
Πίνακας 5: Αριθμός GABA ανοσοθετικών νευρώνων σε κάθε στιβάδα της CA1 και CA3 περιοχής καθώς και της οδοντωτούς έλικας στη ραχιαία και κοιλιακή μοίρα του ιπποκάμπου (immersion fixation).

Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρούνται σε τομές που μονιμοποιήθηκαν με perfusion (πίνακας 6).

Στιβάδα	Ραχιαία μοίρα	Κοιλιακή μοίρα
CA1		
Πολύμορφων κυττάρων	6	6
Πυραμιδική	8	13
Ακτινωτή	5	5
Βοθριώδης-μοριώδης	3	4
Σύνολο	22	28
CA3		
Πολύμορφων κυττάρων	6	7
Πυραμιδική	15	19
Ακτινωτή	4	3
Βοθριώδης-μοριώδης	3	1
Σύνολο	28	30
Οδοντωτή έλικα		
Πύλη	15	18
Κοκκώδης	20	32
Μοριώδης	4	5
Σύνολο	39	55

Πίνακας 6: Αριθμός GABA θετικών νευρώνων σε κάθε στιβάδα της CA1 και CA3 περιοχής καθώς και της οδοντωτής έλικας στη ραχιαία και κοιλιακή μοίρα του ιπποκάμπου (perfusion fixation).

Παρακάτω απεικονίζονται αντιπροσωπευτικά παραδείγματα νευρώνων με θετική ανοσοδραστικότητα στο GABA που καταμετρήθηκαν.

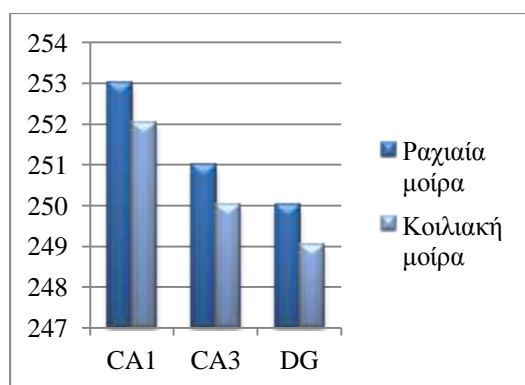


Εικόνα 31: Νευρώνες με θετική ανοσοδραστικότητα στο GABA (A) στην πύλη της οδοντωτής έλικας και (B) στην πυραμιδική στιβάδα της CA3 περιοχής της κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου. Κλίμακα: 40 μ m.

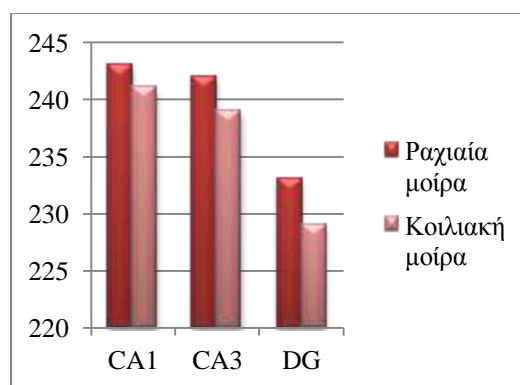
2.2.3 Προσδιορισμός έντασης ανοσοφθορισμού στο GABA στα κυτταρικά σώματα των ενδονευρώνων του ιπποκάμπου

Προκειμένου να συγκριθεί η ένταση ανοσοφθορισμού στο GABA μεταξύ των δύο μοιρών του ιπποκάμπου (ραχιαίος-κοιλιακός), αλλά και μεταξύ των δύο μονιμοποιητικών μεθόδων, μετρήθηκε η μέση ένταση φωτεινότητας στα κυτταρικά σώματα των GABA ανοσοθετικών νευρώνων. Σε τομές που μονιμοποιήθηκαν με immersion, η μέση ένταση ανοσοφθορισμού στις περιοχές CA1, CA3 και DG δεν διέφερε μεταξύ της ραχιαίας και κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου (ραχιαία: 253, 251, 250; κοιλιακή: 252, 250, 249, αντίστοιχα). Παρομοίως, σε τομές που προήλθαν από μονιμοποίηση με perfusion, η μέση ένταση ανοσοφθορισμού στις περιοχές CA1, CA3 και DG δεν διέφερε μεταξύ της ραχιαίας και κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου (ραχιαία: 243, 242, 233; κοιλιακή: 241, 238, 229, αντίστοιχα; σχήμα 1).

A) Immersion Fixation



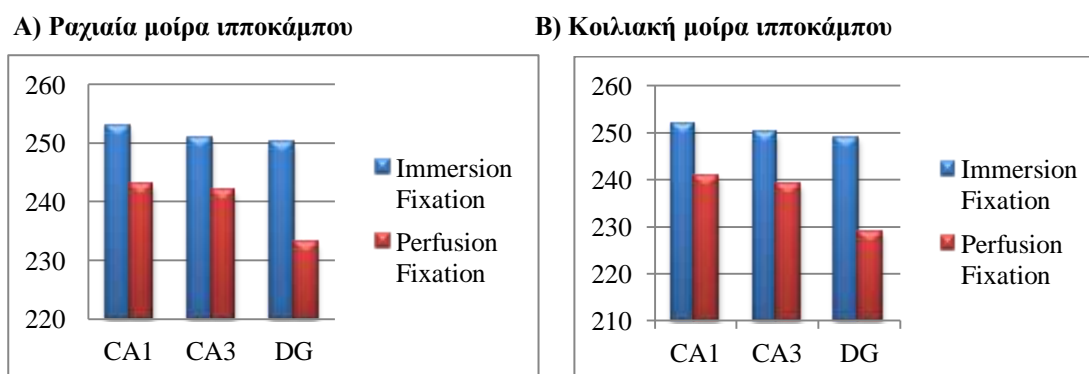
B) Perfusion Fixation



Σχήμα 1: Μέσος όρος της έντασης φωτεινότητας στα κυτταρικά σώματα των νευρώνων με θετική ανοσοδραστικότητα στο GABA (**A**) σε ιππόκαμπο αρουραίου μονιμοποιημένου με εμβύθιση (immersion fixation) και (**B**) σε ιππόκαμπο αρουραίου μονιμοποιημένου μέσω της κυκλοφορίας του αίματος (perfusion fixation).

Ωστόσο, παρατηρήθηκε μεταβολή στην ένταση του ανοσοφθορισμού, όπως αυτή καταγράφηκε με την μέτρηση της μέσης έντασης της φωτεινότητας στα κυτταρικά σώματα των ενδονευρώνων του ιπποκάμπου, μεταξύ των δύο μονιμοποιητικών μεθόδων. Η διαφορά αυτή παρατηρείται τόσο την κοιλιακή όσο και την ραχιαία μοίρα του ιπποκάμπου (σχήμα 2). Ανεξάρτητα από τη μέθοδο μονιμοποίησης που ακολουθήθηκε, η ένταση του φθορισμού φαίνεται να είναι

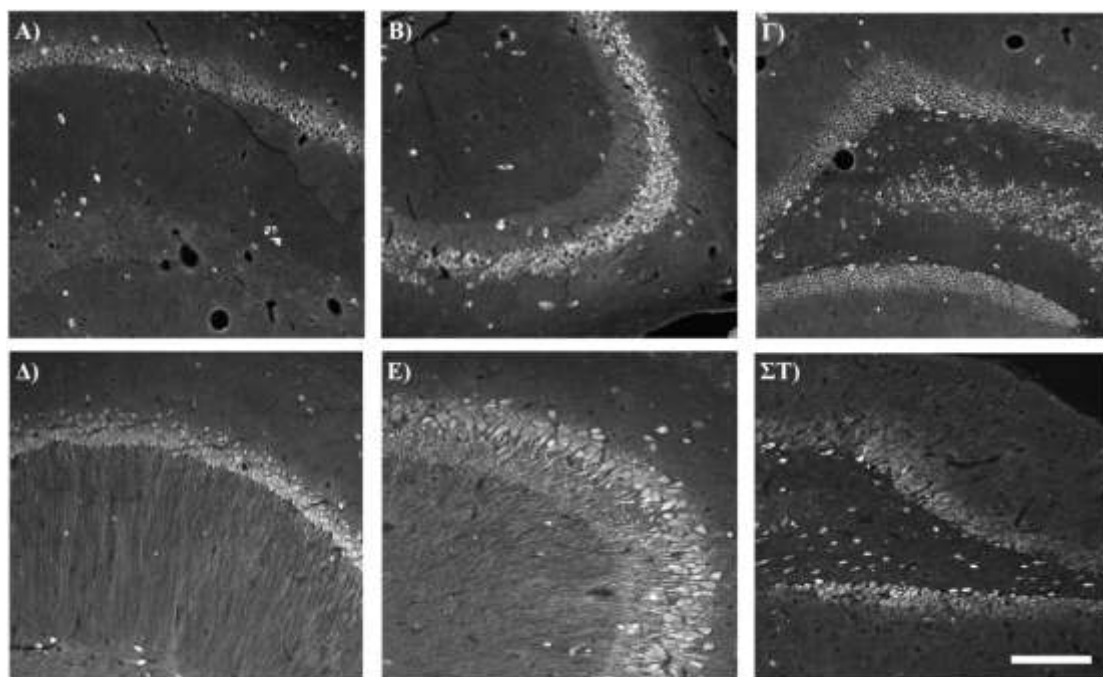
μεγαλύτερη στη CA1 περιοχή και μικρότερη στην οδοντωτή έλικα, τόσο της ραχιαίας όσο και της κοιλιακής μοίρας του υποκάμπου.



Σχήμα 2: Σύγκριση της μέσης έντασης ανοσοφθορισμού του GABA στα κυτταρικά σώματα των ενδονευρώνων του υποκάμπου μεταξύ των δύο μονιμοποιητικών μεθόδων **(A)** στη ραχιαία μοίρα του υποκάμπου και **(B)** στην κοιλιακή μοίρα του υποκάμπου.

2.2.4 Σύγκριση των δύο μονιμοποιητικών μεθόδων

Διαφορές μεταξύ των δύο μονιμοποιητικών μεθόδων (immersion fixation έναντι perfusion fixation) παρατηρούνται ως προς την ποιότητα του ιστού (εικόνα 32). Στις τομές υποκάμπου που μονιμοποιήθηκαν με perfusion, η εικόνα είναι καθαρή και τα περιγράμματα των κυττάρων είναι σαφή. Το σήμα είναι σαφές, οξύ ενώ δεν παρατηρείται περιττή σήμανση. Επίσης τα περιγράμματα των αγγείων του ιστού διαφαίνονται ξεκάθαρα στην εικόνα, καθώς αυτά ήταν ο πρώτος αγωγός από τον οποίο πέρασε το μονιμοποιητικό πριν διηθήσει τον υπόλοιπο ιστό. Στις τομές υποκάμπου που μονιμοποιήθηκαν με immersion, τα περιγράμματα των κυττάρων διακρίνονται επίσης με σαφήνεια. Το σήμα είναι σαφές και οξύ. Ωστόσο, συχνά παρατηρείται η παρουσία σήματος εκτός των αναμενόμενων κυτταρικών ορίων. Τέλος, σε αντίθεση με τη μονιμοποίηση με perfusion, τα περιγράμματα των αγγείων δεν διατηρούνται.



Εικόνα 32: Νευρώνες με θετική ανοσοδραστικότητα στο GABA στη ραχιαία μοίρα ιπποκάμπου μονιμοποιημένου με perfusion (Α-Γ) και ιπποκάμπου μονιμοποιημένου με immersion (Δ-ΣΤ). Α,Δ: CA1 περιοχή. Β,Ε: CA3 περιοχή. Γ,ΣΤ: οδοντωτή έλικα. Κλίμακα: 100 μ m.

2.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο υποκάμπος σχηματισμός του εγκεφάλου των σπονδυλωτών έχει μελετηθεί εκτενώς από ανατόμους, νευροχημικούς, φυσιολόγους, μοριακούς βιολόγους και ψυχολόγους, λόγω της ιδιαίτερης οργάνωσης των νευρωνικών κυκλωμάτων του και του ρόλου του στη φυσιολογία και παθοφυσιολογία του εγκεφάλου. Παρόλο που παλιά θεωρείτο ομοιογενής δομή, σήμερα είναι γνωστό ότι υπάρχουν πολλές διαφορές σε διάφορα επίπεδα οργάνωσης (ανατομία, νευροχημεία, νευρωνικά κυκλώματα, παθοφυσιολογία), μεταξύ διαφραγματικού και κοιλιακού υποκάμπου (Moser and Moser, 1998). Οι διαφορές αυτές πιθανόν να σχετίζονται με τις διαφορετικές λειτουργίες που παρουσιάζουν οι δύο μοίρες του υποκάμπου. Έτσι, ο ραχιαίος υποκάμπος είναι κυρίως υπεύθυνος για τη χωρική μνήμη, ενώ ο κοιλιακός υποκάμπος σχετίζεται με τη συναισθηματική μνήμη (Moser and Moser 1998). Επίσης, μελέτες *in vivo* και *in vitro*, υποστηρίζουν ότι ο κροταφικός πόλος του υποκάμπου εμφανίζει μεγαλύτερη επιρρέπεια προς επιληπτοειδείς εκφορτίσεις (Elul et al., 1964; Racine et al., 1977).

Το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA), αποτελεί τον κύριο ανασταλτικό νευροδιαβιβαστή στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ). Εκφράζεται στους ενδονευρώνες του υποκάμπου, οι οποίοι αποτελούν το 11% των νευρώνων του υποκάμπου. Οι ενδονευρώνες ή GABA νευρώνες του υποκάμπου αναστέλλουν τα πυραμιδικά κύτταρα σχηματίζοντας GABAεργικές συνάψεις σε διάφορα σημεία της μετασυναπτικής τους μεμβράνης. Κάποιοι από αυτούς σχηματίζουν ανασταλτικές συνάψεις στα σώματα των πυραμιδικών νευρώνων ή στο αρχικό τμήμα του νευράξονα, ενώ άλλοι συνάπτονται στους δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων (Freund and Buzaki, 1996).

Από τη βιβλιογραφία προκύπτει ότι ο αριθμός των GABA ενδονευρώνων στην κοιλιακή μοίρα του υποκάμπου είναι μεγαλύτερος από τον αριθμό των GABA ενδονευρώνων στη ραχιαία μοίρα του υποκάμπου (Jinno et al., 2006). Τα δεδομένα αυτά έχουν προκύψει από μελέτες όπου ως μέθοδος μονιμοποίησης χρησιμοποιήθηκε το perfusion, το οποίο αποτελεί τη μέθοδο αναφοράς για τη μελέτη του ΚΝΣ. Στην παρούσα εργασία, μελετήσαμε την ανοσοϊστοχημική έκφραση του GABA στη ραχιαία και κοιλιακή μοίρα, σε τομές υποκάμπου μονιμοποιημένες μέσω εμβύθισης σε μονιμοποιητικό διάλυμα, καθώς από τη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν δεδομένα.

Στόχος μας ήταν, να εξετάσουμε εάν η μονιμοποίηση με immersion είναι μία εξίσου καλή εναλλακτική μέθοδος μονιμοποίησης για τη μελέτη της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του GABA. Για το σκοπό αυτό, η παρούσα εργασία επικεντρώθηκε στα εξής ερωτήματα:

- ο αριθμός των GABA νευρώνων επηρεάζεται από τη μέθοδο μονιμοποίησης;
- η ένταση του φθορισμού επηρεάζεται τη μέθοδο μονιμοποίησης;
- η ποιότητα του ιστού και κατ' επέκταση η ποιότητα της ανοσοϊστοχημικής χρώσης επηρεάζεται από τη μέθοδο μονιμοποίησης;

Τα κύρια ευρήματά μας συνοψίζονται ως εξής: α) ο αριθμός των GABA ανοσοδραστικών νευρώνων είναι μεγαλύτερος στην κοιλιακή μοίρα του ιπποκάμπου σε σχέση με τη ραχιαία μοίρα του ιπποκάμπου, β) ο αριθμός των GABA ενδονευρώνων δεν μειώνεται σε τομές ιπποκάμπου μονιμοποιημένες με εμβύθιση σε μονιμοποιητικό διάλυμα (immersion fixation) και γ) η ένταση του ανοσοφθορισμού αυξάνεται σε τομές ιπποκάμπου μονιμοποιημένες με εμβύθιση.

2.3.1 Αποτίμηση μεθοδολογίας

Η ακριβής εκτίμηση της έκφρασης του γ-αμινοβουτυρικού οξέος στη ραχιαία και κοιλιακή μοίρα του ιπποκάμπου, απαιτεί μία τεχνική μονιμοποίησης που να διατηρεί τη μορφολογία του ιστού με όσο το δυνατό μικρότερη απόκλιση από τη ζωντανή μορφή. Έχει αναφερθεί, ότι νεκρωτικά στοιχεία στον ιστό, τα οποία μπορεί να δημιουργηθούν λόγω καθυστερημένης έναρξης της μονιμοποίησης, λόγω μη ικανοποιητικής διήθησης του μονιμοποιητικού έως το κέντρο του ιστού, μπορεί να δημιουργήσουν προβλήματα στο τελικό στάδιο της ανοσοϊστοχημικής χρώσης, εξαιτίας μη ειδικής σύνδεσής τους με συγκεκριμένα αντισώματα (Beach et al., 1987).

Κατά τη μονιμοποίηση με perfusion ο ιστός εμποτίζεται με το μονιμοποιητικό διάλυμα σε πολύ μικρό χρόνο μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Στην παρούσα μελέτη, επιλέξαμε να επεξεργαστούμε τον ιππόκαμπο από το ένα μόνο ημισφαίριο του κάθε πειραματόζωου, με σκοπό να μειώσουμε τον χρόνο ισχαιμίας του ιστού και να διασφαλίσουμε την καλύτερη βιωσιμότητά του. Επίσης, φροντίσαμε ώστε ο χρόνος που παρεμβάλλεται από τη στιγμή αποκεφαλισμού του ζώου μέχρι την τοποθέτηση των τομών στο μονιμοποιητικό διάλυμα, να μην ξεπερνάει τα 5 λεπτά. Το διάστημα αυτό αναφέρεται στη βιβλιογραφία ως *post-mortem interval* ή

prefixation time και θα πρέπει να είναι όσο το δυνατό μικρότερο καθώς η διαδικασία αυτόλυσης του ιστού ξεκινάει άμεσα από τη στιγμή που διακόπτεται η κυκλοφορία του αίματος. Ωστόσο, στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι κυρίως οι πυραμιδικοί νευρώνες είναι ευαίσθητοι στην ισχαιμία, ενώ οι ενδονευρώνες είναι ανθεκτικοί (Avignone et al., 2005). Επομένως, θεωρούμε πως το διάστημα που μεσολαβεί από τον αποκεφαλισμό του πειραματοζώου μέχρι τη στιγμή εισόδου του ιστού στο μονιμοποιητικό διάλυμα δεν έχει επίπτωση στην επιβίωση των GABA νευρώνων.

Στη διεθνή βιβλιογραφία τίθεται από παλαιότερα το ερώτημα της ικανοποιητικής διήθησης του ιστού σε βάθος με το μονιμοποιητικό, αλλά και μόνο με την εμβύθισή του. Υπάρχει το ερώτημα σχετικά με τη επάρκεια της μονιμοποίησης στο κέντρο κάθε τομής (Beach, 1987). Στην παρούσα μελέτη, επιλέξαμε να λάβουμε τομές πάχους 500μm από την κάθε μοίρα του ιπποκάμπου, προκειμένου να διασφαλίσουμε ότι το μονιμοποιητικό θα φτάσει στο κέντρο του ιστού μέσα σε μικρό χρονικό διάστημα, χωρίς επίπτωση ως προς τη βιωσιμότητά του. Για την επιλογή του συγκεκριμένου πάχους τομών λάβαμε επίσης υπόψιν μας, τη μηχανική βλάβη που αναπόφευκτα υφίσταται ο ιστός στην επιφάνεια του. Στην περίπτωση του ιπποκάμπου τα κύτταρα έχουν μέγεθος 50-100μm και επομένως ο ιστός είναι μορφολογικά ανέπαφος σε βάθος 100-200μm από την επιφάνεια τομής.

Τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας, υποδεικνύουν ότι η τομή ιπποκάμπου πάχους 500μm διηθείται ικανοποιητικά έως το κέντρο και μπορεί να εξασφαλίσει υγιή ιστό κατάλληλο για περαιτέρω ανοσοϊστοχημική χρώση.

2.3.2 Αριθμός GABA νευρώνων στη ραχιαία και κοιλιακή μοίρα του ιπποκάμπου

Έχει αναφερθεί ότι ο αριθμός των GABA νευρώνων στην κοιλιακή μοίρα του ιπποκάμπου είναι μεγαλύτερος σε σύγκριση με τη ραχιαία μοίρα του ιπποκάμπου (Jinno et al., 1998; Jinno et al., 2006). Η μεγαλύτερη συγκέντρωση GABA νευρώνων απαντάται στην οδοντωτή έλικα, ενώ η μικρότερη στην CA1 περιοχή του ιπποκάμπου (Somogyi et al., 1984; Hortnagl et al., 1991; Jinno et al., 1998). Ο μεγαλύτερος αριθμός των GABA ενδονευρώνων απαντάται στην πυραμιδική στιβάδα της CA1 και CA3 περιοχής καθώς και στη κοκκώδη στιβάδα της οδοντωτής έλικας (Gamrani et al., 1986; Woodson et al., 1989; Jinno et al., 1998).

Τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν στην παρούσα εργασία συμφωνούν με τα ανωτέρω. GABA ενδονευρώνες παρατηρήθηκαν σε όλες τις στιβάδες και σε όλες τις υποπεριοχές του ιπποκάμπου και στις δύο μοίρες. Στη ραχιαία μοίρα του

ιποκάμπου ο αριθμός των ενδονευρώνων με θετική ανοσοδραστικότητα στο GABA ήταν μικρότερος σε σχέση με την κοιλιακή μοίρα του ιποκάμπου. Η σημασία της διαφοράς αυτής σε επίπεδο φυσιολογίας και παθοφυσιολογίας δεν είναι γνωστή. Ωστόσο, ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός, ότι η κοιλιακή μοίρα του ιποκάμπου, όπως ήδη αναφέρθηκε, παρουσιάζει αυξημένη επιρρέπεια προς επιληπτοειδείς εκφορτίσεις.

Επίσης, από την καταμέτρηση των GABA θετικών νευρώνων, σε τομές ιποκάμπου μονιμοποιημένες με εμβύθιση σε μονιμοποιητικό διάλυμα και σε τομές ιποκάμπου μονιμοποιημένες μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, δεν φαίνεται να υπάρχει σημαντική διαφορά ως προς τον αριθμό των GABA νευρώνων στις δύο μοίρες του ιποκάμπου, ανάμεσα στις δύο μεθόδους. Αυτό πιθανώς υποδεικνύει ότι ο ιστός διηθείται γρήγορα και σε ικανοποιητικό βαθμό ως το κέντρο. Επίσης, λαμβάνοντας υπόψη την ισχαιμική καταπόνηση που αναπόφευκτα υφίσταται ο ιστός από τη στιγμή που διακόπτεται η κυκλοφορία του αίματος κατά την διαδικασία της μονιμοποίησης με εμβύθιση, το γεγονός ότι ο αριθμός των GABA νευρώνων δεν επηρεάζεται, επιβεβαιώνει τη γνωστή άποψη ότι οι ενδονευρώνες είναι ανθεκτικοί στην ισχαιμία.

2.3.3 Ένταση φθορισμού GABA νευρώνων

Δεν παρατηρήθηκε μεταβολή της έντασης του ανοσοφθορισμού στα κυτταρικά σώματα των GABA θετικών νευρώνων, ανάμεσα στη ραχιαία και κοιλιακή μοίρα του ιποκάμπου, στις δύο μεθόδους. Ωστόσο, παρατηρήθηκε μεταβολή στην ένταση του φθορισμού ανάμεσα στις μονιμοποιημένες μέσω εμβύθισης τομές ιποκάμπου και στις μονιμοποιημένες μέσω της κυκλοφορίας του αίματος τομές ιποκάμπου. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην ισχαιμική καταπόνηση που αναπόφευκτα υφίσταται ο ιστός κατά την μονιμοποίηση με εμβύθιση λόγω της διακοπής της κυκλοφορίας του αίματος μέχρι το μονιμοποιητικό να διηθήσει όλη την έκταση του ιστού.

Από τη στιγμή που διακόπτεται η κυκλοφορία του αίματος στον εγκέφαλο, ξεκινάει η ισχαιμία του ιστού. Το γλουταμικό οξύ αποτελεί τον κύριο μεσολαβητή στην απόκριση στην ισχαιμία. Όπως έχει αναφερθεί, το γλουταμικό οξύ απελευθερώνεται μαζικά στη συναπτική σχισμή και ενεργοποιεί τους NMDA υποδοχείς. Η ενεργοποίηση των υποδοχέων αυτών έχει σαν τελικό αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο (Lee et al., 2000). Ωστόσο, σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, κατά την ισχαιμία ο οργανισμός επιστρατεύει επίσης ενδογενείς προστατευτικούς

μηχανισμούς, ένας από τους οποίους είναι η ενεργοποίηση των ενδονευρώνων με αποτέλεσμα την απελευθέρωση GABA στη συναπτική σχισμή (Lee et al., 2000). Η αύξηση της ποσότητας του GABA εντός των κυτταρικών σωμάτων, όπως αυτή καταγράφηκε με την αύξηση της έντασης της φωτεινότητας στις μονιμοποιημένες με εμφύτιση τομές, πιθανώς να οφείλεται στην ενεργοποίηση των ενδονευρώνων ως απάντηση στην ισχαιμία. Κατά την ισχαιμία παρατηρείται αύξηση της συνολικής ποσότητας του GABA, τόσο ενδοκυτταρικά όσο και εξωκυτταρικά σε ολόκληρο τον εγκέφαλο (Yamatsu et al., 1982). Αυτό πιθανώς οφείλεται σε αποτυχία του συστήματος αποικοδόμησης του GABA, σε συνδυασμό με τη συνεχή δράση της GAD, η οποία παράγει συνεχώς GABA (Perry et al., 1981).

Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η ένταση της φωτεινότητας είναι μεγαλύτερη στη CA1 και μικρότερη στην οδοντωτή έλικα. Έχοντας υπόψιν μας τα παραπάνω, η μεγαλύτερη ένταση φθορισμού που παρατηρείται στη CA1 περιοχή, πιθανώς να οφείλεται στο γεγονός ότι η CA1 περιοχή είναι μία από τις πλέον ευαίσθητες περιοχές στην ισχαιμία, ενώ οι παρακείμενες περιοχές CA3 και οδοντωτή έλικα είναι σχετικά ανθεκτικές. Γενικά, η ευπάθεια στη ισχαιμία των υποπεριοχών του υποκάμπου ακολουθεί την εξής σειρά: CA1 > CA3 > οδοντωτή έλικα (Schmidt-Kastner and Freund, 1991).

2.3.4 Ποιότητα ιστού

Διαφορές παρατηρήθηκαν στην ανοσοϊστοχημική εικόνα μεταξύ των δύο μονιμοποιητικών μεθόδων. Στις τομές που μονιμοποιήθηκαν με perfusion, όπως ήδη αναφέρθηκε, η εικόνα είναι καθαρή και το GABA σήμα σαφές, ενώ στις τομές που μονιμοποιήθηκαν με immersion παρατηρείται GABA σήμα εκτός των αναμενόμενων κυτταρικών ορίων. Αυτό πιθανώς οφείλεται στο γεγονός ότι, το GABA απελευθερώνεται στη συναπτική σχισμή προκειμένου να μετριάσει την επιβλαβή επίδραση του γλουταμικού οξέως, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω. Η παρουσία σήματος εκτός των αναμενόμενων κυτταρικών ορίων, θα μπορούσε όμως να αποτελεί ένδειξη αυτόλυσης. Ωστόσο απομακρυνόμεστε από αυτό το ενδεχόμενο, καθώς με τη χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης διασφαλίσαμε ότι ο ιστός ο οποίος επεξεργάστηκε περαιτέρω με χρώση ανοσοφθορισμού είναι υγιής, χωρίς στοιχεία νέκρωσης.

2.4 ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το γ-Αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) αποτελεί τον κύριο ανασταλτικό νευροδιαβιβαστή στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα. Εκφράζεται στους ενδονευρώνες του ιπποκάμπου, οι οποίοι αντιπροσωπεύουν το 11% των νευρώνων του ιπποκάμπου. Είναι πλέον γνωστό ότι, η ραχιαία και η κοιλιακή μοίρα του ιπποκάμπου διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την κατανομή των GABA νευρώνων. Τα δεδομένα αυτά προκύπτουν από μελέτες όπου η μονιμοποίηση έγινε μέσω της κυκλοφορίας του αίματος.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να αποτυπώσει την ανοσοϊστοχημική έκφραση του GABA στη ραχιαία και κοιλιακή μοίρα του ιπποκάμπου, σε λεπτές τομές ιπποκάμπου μονιμοποιημένες με εμβύθιση, καθώς από τη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν δεδομένα. Στόχος μας ήταν, να εξετάσουμε εάν η μονιμοποίηση με εμβύθιση είναι μία εξίσου καλή εναλλακτική μέθοδος μονιμοποίησης.

Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήσαμε ανοσοϊστοχημική μελέτη με τη χρήση πολυκλωνικών αντισωμάτων έναντι του GABA, σε τομές ιπποκάμπου μονιμοποιημένες με εμβύθιση. Έγινε καταμέτρηση των νευρώνων με θετική ανοσοδραστικότητα στο GABA καθώς και μέτρηση της μέσης έντασης φωτεινότητας στα κυτταρικά σώματα των GABA ανοσοθετικών νευρώνων. Η σύγκριση έγινε με δεδομένα από το αρχείο του εργαστηρίου μας, όπου για τη μελέτη της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του GABA στον ιπποκάμπο, πραγματοποιήθηκε μονιμοποίηση μέσω της κυκλοφορίας του αίματος.

Παρατηρήσαμε ότι, ο αριθμός των GABA νευρώνων στην κοιλιακή μοίρα του ιπποκάμπου είναι μεγαλύτερος σε σχέση με την ραχιαία μοίρα σε λεπτές τομές ιπποκάμπου μονιμοποιημένες με εμβύθιση. Επιπλέον, ο αριθμός των GABA νευρώνων στις δύο μοίρες του ιπποκάμπου δεν μειώθηκε στις μονιμοποιημένες με εμβύθιση τομές. Ωστόσο, παρατηρήθηκε αύξηση της έντασης του ανοσοφθορισμού στις μονιμοποιημένες με εμβύθιση τομές.

Στην παρούσα μελέτη επιβεβαιώνεται η διαφορά μεταξύ ραχιαίας και κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου ως προς τον αριθμό των GABA νευρώνων, σε λεπτές τομές ιπποκάμπου μονιμοποιημένες με εμβύθιση. Η αύξηση της έντασης του φθορισμού, στις μονιμοποιημένες με εμβύθιση τομές, πιθανόν να οφείλεται στην ισχαιμική καταπόνηση του ιστού.

2.5 SUMMARY

Gamma-aminobutyric acid (GABA), is the main inhibitory neurotransmitter in the Central Nervous System. It is expressed in the interneurons of hippocampus, which represent 11% of the hippocampal neurons. It is now known that, the distribution of GABA neurons differs along the dorsoventral axis of the hippocampal formation. These data derive from studies, where perfusion-fixation method was used for the fixation of the brain tissue.

The aim of this study was to depict the immunocytochemical expression of GABA along the dorsoventral axis of the hippocampal formation, in thin hippocampal slices fixed with the immersion-fixation method, because there are no data in the literature. Our goal was to examine whether the immersion-fixation method is as an equally good alternative technique for the fixation of the hippocampal tissue.

For this purpose, we performed an immunocytochemical study using polyclonal antibodies against GABA, in thin hippocampal slices fixed with the immersion-fixation method. We estimated the GABA immunoreactive neurons and the mean luminance intensity in the dorsal and ventral part of the hippocampal formation. We compared our results with data from the file of our laboratory, where the perfusion-fixation method was used in order to study the immunocytochemical expression of GABA in the hippocampal formation.

We observed that the number of GABA immunoreactive neurons was larger at the ventral level than at the dorsal level in thin hippocampal slices fixed with the immersion-fixation method. Moreover, we observed that the number of GABA immunoreactive neurons was not decreased in slices fixed with the immersion-fixation method. However, there was an increase in the intensity of the immunofluorescence in the immersion-fixed slices.

In our study, we confirmed the dorsoventral difference in the number of GABA neurons in the immersion-fixed slices. The increase in the intensity of the immunofluorescence is probably due to the ischemic tissue strain.

2.6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Akai F., Yanagihara T. (1993) Identity of the dorsal hippocampal region most vulnerable to cerebral ischemia. *Brain Res.* 603(1): 87–95.
- Alakuijala A., Alakuijala J., Pasternack M. (2006) Evidence for functional role of GABA_C receptors in the rat mature hippocampus. *European Journal of Neuroscience* 23(2): 514-520.
- Amaral D. G. (1986) Amygdalohippocampal and amygdalocortical projections in the primate brain. *Adv Exp Med Biol* 203: 3-17.
- Amaral D. G. and Witter M. P. (1989) The three dimensional organization: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31(3): 571-591.
- Amaral D. G., Witter M. P. (1995) *Hippocampal Formation. In: The Rat Nervous System.* Academic Press.
- Andersen P., Bliss T. V., Skrede K. K. (1971) Unit analysis of the hippocampal population spikes. *Exp. Brain. Res.* 13(2): 208-221.
- Andersen P., Morris R., Amaral D., Bliss T., O'Keefe J. (2007) *The Hippocampus Book.* Oxford: Oxford University Press.
- Anderson K. J., Maley B. E., Scheff S. W. (1986) Immunocytochemical localization of gamma-aminobutyric acid in the rat hippocampal formation. *Neurosci. Lett.* 69(1):7-12.
- Arabadzisz D., Freund T. F. (1999) Changes in excitatory and inhibitory circuits of the rat hippocampus 12-14 months after complete forebrain ischemia. *Neuroscience* 92(1): 27-45.
- Arregui A., Barrer G. R. (1980) Chronic Hypoxia in rats: alterations of stratio-nigral angiotensin converting enzyme, GABA and Glutamic acid decarboxylase. *Journal of Neurochemistry* 34(3): 740-743.
- Avignone E., Frenguelli B. G., Irving A. J. (2005) Differential responses to NMDA receptor activation in rat hippocampal interneurons and pyramidal cells may underlie enhanced pyramidal cell vulnerability. *Eur J Neurosci.* 22(12): 3077-3090.
- Barker J. L. and Ranson B. R. (1978) Amino acid pharmacology of mammalian central neurons grown in tissue culture. *The Journal of physiology* 280: 331-354.
- Bancroft J.D., Stevens A. (1996) *Theory and Practice of Histological Techniques.* Edinburgh, Churchill Livingstone, pp 766.
- Bazemore A., Florey E. (1957) Isolation of factor I. *Journal of Neurochemistry* 1(4): 334-339.

- Beach T. G., Tago H., Nagai T., Kimura H., McGeer P. L., McGeer E. G. (1987) Perfusion-fixation of the human brain for immunohistochemistry: comparison with immersion-fixation. *J. Neurosci. Meth.* 19(3): 183-192.
- Berberich S., Jensen V., Hvalby O., Seeburg P. H., Kohr G. (2007) The role of NMDAR subtypes and change transfer during hippocampal LTP induction. *Neuropharmacology* 52(1): 77-86.
- Boenisch T. (2001) *Handbook Immunochemical Staining Methods*, 3rd Edition. CA, USA.
- Blum F. (1983) *Der formaldehyde als antisepticum*. Munch Med Wochenschr 8 Aug: 601.
- Bohme G. A., Bon C., Lemaire M., Reinband M., Piot O., Stutzmann J. M., Doble A., Blanchard J. C. (1993) Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 20(19): 298-303.
- Borck C., Jeffreys J. G (1999) Seizure-like events in disinhibited ventral slices of adult rat hippocampus. *J. Neurophysiol.* 82(5): 2130-2142.
- Bormann J. and Feigenspan A. (1995) GABA_C receptors. *Trends in neurosciences* 18(12): 515-519.
- Bowers G., Cullinam W. E., Herman J. P. (1998) Region-specific regulation of glutamic acid decarboxylase (GAD) mRNA expression in central stress circuit. *J. Neuroscience* 18(15): 5938-5947.
- Burnham W. M. (1975) Primary and transfer seizure development in the kindled rat. *Can. J. Neurol. Sci.* 2(4): 417-428.
- Burwell R. D., Amaral D. G. (1998) Perirhinal and postrhinal cortices of the rat: Interconnectivity and connections with the entorhinal cortex. *Journal of Comparative Neurology* 391(3): 293-321.
- Canteras N/ S., Swanson L. W. (1992) Projections of the ventral subiculum to the amygdala, septum and hypothalamus: a PHAL anterograde tract-tracing study in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 324(2): 180-194.
- Carew T. J. (2000) *Spatial navigation in Rats*. In: Behavioral Neurobiology. Sunderland, M. A.
- Chebib M. and Johnston G. A. (1999) The ABC of GABA receptors: a brief review. *Clinical and experimental pharmacology and physiology* 26(11): 937-940.
- Chen L., Huang L. Y. (1992) Protein kinase C reduces Mg⁺⁺ block of NMDA receptor channels as a mechanism of modulation. *Nature.* 356(6369): 521-523.

- Gilbert M., Racine R. J., Smith G. K. (1985) Epileptiform burst responses in ventral vs dorsal hippocampal slices. *Brain Res* 361(1-2): 389-391.
- Carson, Freida L, Christa Hladik. (2009) *Histotechnology: A Self-Instructional Text* (3rd ed.). Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press.
- Cobos I., Calcagno M. E., Vilaythong A. J., Thwin M. T., Noebels J. L., Baraban S. C., Rubenstein J. L. (2005) Mice lacking *Dlx1* show subtype-specific loss of interneurons reduced inhibition and epilepsy. *Nat. Neurosci.* 8(8): 1059-1068.
- Colombo M., Fernandez T., Nakamura K., Gross C. G. (1998) Functional differentiation along the anterior-posterior axis of the hippocampus in monkeys. *J. Neurophysiol* 80(2): 1002-1005.
- Couve A., Moss S. J., Pangalos M. N. (2000) GABA_B receptors: a new paradigm in G-protein signaling. *Molecular and cellular neurosciences* 16(4):296-312.
- Deacon T. W., Eichenbann H., Rosenberg P., Echmann K. W. (1983) Afferent connections of the perirhinal cortex in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 220(2): 168-190.
- de Hoz L., Knox J., Morris R. G. (2003) Longitudinal axis of the hippocampus: both septal and temporal poles of the hippocampus support water maze spatial learning depending on the training protocol. *Hippocampus* 13(5): 587-603.
- Deller T., Adelmann G., Nitsch R., Frotscher M. (1996) The alvear pathway of the rat hippocampus. *Cell Tissue Res.* 286 (3): 293-303.
- Elul R. (1964) Regional differences in the hippocampus of the cat. I. Specific discharge patterns of the dorsal and ventral hippocampus and their role in the generalized seizures. *Electroencephalogr. Clin Neurophysiol* 16: 470-488.
- Fernandez G., Weyerts H., Schrader-Bolsche M., Tendolkar I., Smid H. G., Tempelmann C., Hinrichs H., Scheich H., Elger C. E., Mangun G. R., Heinze H. J. (1998) Successful verbal encoding into episodic memory engages the posterior hippocampus: a parametrically analyzed functional magnetic resonance imaging study. *J. Neurosci.* 18(5): 1841-1847.
- Fox C.H. (1985) Formaldehyde fixation. *J. Histochem Cytochem.* 33(8) :845-53.
- Freund T. F., Martin K. A. C., Smith A. D., Somogyi P. (1983) Glutamate decarboxylase-immunoreactive terminals of Golgi-impregnated axo-axonic cells and presumed basket cells in synaptic contact with pyramidal neurons of cats visual cortex. *Journal of Comparative Neurology* 221(3): 263-278.
- Freund T. F. and Buzaki G. (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6(4): 347-470.
- Freund T. F. (2003) Interneurone Diversity series: Rhythm and mood in perisomatic inhibition. *Trends in Neuroscience* 26(9): 489-495.

Fukuda T., Heizmann W. C., Kosaka T. (1997) Quantitative analysis of GAD65 and GAD67 immunoreactivities in somata of GABAergic neurons in the mouse hippocampus proper (CA1 and CA3 regions), with special reference to parvalbumin-containing neurons. *Brain Research* 764(1-2): 237-243.

Gamrani H., Onteniente B., Seguela P., Geffard M., Calas A. (1986) Gamma-aminobutyric acid immunoreactivity in the rat hippocampus. A light and electron microscopic study with anti-GABA antibodies. *Brain Res.* 364(1): 30-34.

Goldring S., Edwards I., Harding G. W., Bernardo K. L. (1992) Results of anterior temporal lobectomy that spares the amygdale in patients with complex partial seizures. *J. Neurosurg* 77(2): 185-193.

Greco B., Prevost J., Gioanni Y. (1994) Intracerebral microinjections of dermorphin: search of the epileptic induction thresholds. *Neuroreport* 5(16): 2169-2172.

Green J. D. (1964) The Hippocampus. *Physiol. Rev.* 44(4): 561-608.

Green J. R., Scheetz D. G. (1964) Surgery of epileptogenic lesions of the temporal lobe. *Arch Neurol* 10(2): 135-148.

Gage G. J., Kipke D. R., Shain W. (2012) Whole Animal Perfusion Fixation for Rodents. *J. Vis. Exp.* 30(65): e3564.

Grivas H., Michaloudi Ch., Batzios Ch., Chiotelli M., Papatheodoropoulos C., Kostopoulos G., Papadopoulos G. C. (2003) Vascular network of the rat hippocampus is not homogenous along the septotemporal axis. *Brain Res.* 971(2): 245-249.

Haley J. E., Wilcox G. L., Chapman P. F. (1992) The role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. *Neuron* 8(2): 211-216.

Henke P. G. (1990) Hippocampal pathway to the amygdale and stress ulcer development. *Brain research bulletin* 25(5): 691-695.

Herman J. P., Dolgas C. M., Carlson S. L. (1998) Ventral subiculum regulates hypothalamo-pituitary-adrenocortical and behavioural responses to cognitive stressors. *Neuroscience* 86(11): 449-459.

Hock B. J., Bunsey M. D. (1998) Differential effects of dorsal and ventral hippocampal lesions. *J Neurosci.* 18(17): 7017-7032.

Holscher C. (1997) Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity. *Trends in Neuroscience.* 20(7): 298-303.

Hortnagl H., Berge M. I., Sperk G., Pifl C. (1991) Regional heterogeneity in the distribution of neurotransmitter markers in the rat hippocampus. *Neuroscience* 45(2): 261-271.

Houser R. C. and Esclapez M. (1994) Localization of mRNAs encoding two forms of Glutamic Acid Decarboxylase in the Rat hippocampal formation. *Hippocampus* 4(5): 530-545.

Hughes K. R. (1965) Dorsal and ventral hippocampus lesions and maze learning: influence of preoperative environment. *Can. J. Psychol.* 19(4): 325-332.

Jacob C. T., Moss J. S., Jurd R. (2008) GABA_A receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nature Reviews Neuroscience* 9(5): 331-343.

Javois L. C. (1999) *Methods in Molecular Biology*, Vol. 115: Immunocytochemical Methods and Protocols Edited by: L. C. Javois © Humana Press Inc., Totowa, NJ.

Jeltsch H., Cassel J. C., Simler S., Lazarus C., Keche C., Hertting G., Jackish R., Will R. (1994) Hippocampal amino acid concentrations after raphe and/or septal cell suspension grafts in rats with fimbria-fornix lesions. *Neurosci.* 63(1): 41-45.

Jinno S., Aika Y., Fukuda T., Kosaka T. (1998) Quantitative analysis of GABAergic neurons in the mouse hippocampus, with optical dissector using confocal laser scanning microscope. *Brain Res.* 814(1-2): 55-70.

Jinno S., Aika Y., Fukuda T., Kosaka T. (1999) Quantitative analysis of neuronal nitric oxide synthase-immunoreactive neurons in the mouse hippocampus with optical dissector. *Journal of Comparative Neurology* 410(3): 398-412.

Jinno S., Kosaka T. (2002) Patterns of expression of calcium-binding proteins and neuronal nitric oxide synthase in different populations of hippocampal GABAergic neurons in mice. *Journal of Comparative Neurology* 449(1): 1-25.

Jinno S., Kosaka T. (2003b) Patterns of expression of neuropeptides in GABAergic non principal neurons in the mouse hippocampus: quantitative analysis with optical dissector. *Journal of Comparative Neurology* 461(3): 333-349.

Jinno S., Kosaka T. (2004) Patterns of colocalization of neuronal nitric oxide synthase and somatostatin-like immunoreactivity in the mouse hippocampus: quantitative analysis with optical dissector. *Neuroscience* 124(4): 797-808.

Jinno S., Kosaka T. (2006) Cellular architecture of the mouse hippocampus: A quantitative aspect of chemically defined GABAergic neurons with stereology. *Neuroscience Research* 56(3):229-245.

Johnston D., Amaral D. G. (1998) *The synaptic organization of the brain*. Oxford University press.

Johnston G. A. (1996) GABA_C receptors: relatively simple transmitter-gated ion channels. *Trends in pharmacological sciences* 17(9): 319-323.

Jung M. W., Wiener S. I., McNaughton B. L. (1994) Comparison of spatial firing characteristics of units in dorsal and ventral hippocampus of the rat. *The Journal of Neuroscience* 14(12): 7347-7356.

Kahle W., Frotscher M. (2009) *Εγχειρίδιο περιγραφικής ανατομικής*. Εκδόσεις: Π. Χ. Πασχαλίδης.

Kandel E. R., Schwartz J. H., Jessel T. N. (1999) *Νευροεπιστήμη και συμπεριφορά*. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης.

Kasukurthi R., Brennerb M. J., Moorea A. M., Moradzadehc A., Ray W. R., Santosaa K. B., Mackinnona S. E., Huntera D. E. (2009) Transcardial perfusion versus immersion fixation for assessment of peripheral nerve regeneration. *J Neurosci. Meth.* 184(2): 303–309.

Kim H. J., Routtenberg A. (1976) Retention disruption following post-trial picrotoxin injection into the substantia nigra. *Brain Res* 113(3): 620-625.

Kjelstrup K. G., Tuvnes F. A., Steffenach H. A., Murison R., Moser M. B. (2002) Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99(16):10825-10830.

Kohler C., Schultzberg M., Radesater A. C. (1987) Distribution of neuropeptide Y receptors in the rat hippocampal region. *Neurosci. Lett.* 75(2): 141-146.

Kosaka T., Katsumaru H., Hama K., Wu J-Y., Heizmann C. W. (1987) GABAergic neurons containing Ca^{2+} binding proteins parvalbumin in the rat hippocampus and Dentate Gyrus. *Brain Res.* 419(1-2): 119-130.

Kosaka T., Wu J-Y., Benoit R. (1988) GABAergic neurons containing somatostatin-like immunoreactivity in the rat hippocampus and Dentate Gyrus. *Exp. Brain Res.* 71(2):388-398.

Kosaka T., Kosaka K., Tateishi T., Hamaoka Y., Yanaihara N., Wu J-Y., Hama K. (1985) GABAergic neurons containing CCK-8-like and/or VIP-like immunoreactivities in the rat hippocampus and Dentate Gyrus. *Journal of Comparative Neurology* 239(4): 420-430.

Lavenex P., Lavenex P. B., Bennett J. L., Amaral D. G. (2009) Postmortem changes in the neuroanatomical characteristics of the primate brain: the hippocampal formation. *J Comp Neurol.* 512(1):27-51.

Lee J. M., Crabb M. C., Zipfel G. J., Choi D. W. (2000) Brain tissue responses to ischemia. *The Journal of Clinical Investigation.* 106(6): 723-31.

Lee K. S., Reddington M., Schuber P., Kreutzbert G. (1983) Regulation of the strength of adenosine modulation in the hippocampus by differential distribution of CA1 receptors. *Brain Res.* 260(1): 156-159.

- Lee P. H., Xie C. W., Lewis D. V., Wilson W. A., Mitchell C. L., Hong J. S. (1990) Opioid-induced epileptiform bursting in hippocampal slices: higher susceptibility in ventral than dorsal hippocampus. *J. Pharmacol Exp Ther* 253(2): 545-551.
- Loewy A. D. (1991) Forebrain nuclei involved in autonomic control. *Prog Brain Res* 87: 253-268.
- Lorente de No R. (1933) Studies on the structure of the cerebral cortex I. The area entorhinalis. *J. Psychol. Neurol.* 45: 381-438.
- Lorente de No R. (1934) Studies on the structure of the cerebral cortex II. Continuation of the study of the ammonic system. *J. Psychol. Neurol.* 46: 3-1.
- Low W. C., Roepke J., Farber S. D., Hill T. G., Sattin A., Kubek M. J. (1989) Distribution of thyrotropin-releasing hormone (TRH) in the hippocampal formation as determined by radioimmunoassay. *Neurosci. Lett.* 103(3): 314-319.
- Maccaferri G. and Lacaille J. C. (2003) Interneuron diversity series: Hippocampal interneuron classifications-making things as simple as possible, not simpler. *Trends in Neuroscience* 26(10): 567-571.
- Macdonald R. L., Olsen R., W. (1994) GABA_A receptor channels. *Annual review of neuroscience* 17: 569-602.
- Mao J., Price D. D., Philips L. L., Lu J., Mayer J. D. (1995) Increases in protein kinase C gamma immunoreactivity in the spinal cord of rats associated with tolerance to the analgesic effects of morphine. *Brain Res.* 677(2): 257-67.
- Martens U., Capito B., Wree A. (1998) Septotemporal distribution of [³H]MK-801, [³H]AMPA and [³H]Kainate binding sites in the rat hippocampus. *Anat. Embryol.* 198(3): 195-204.
- Masukawa L. M., O'Connor W. M., Lynott J., Burdette L. J., Uruno K., McGonigle P., O'Connor M. J. (1995) Longitudinal variation in cell density and mossy fiber reorganization in the dentate gyrus from temporal lobe epileptic patients. *Brain Res* 678(1-2): 65-75.
- Metha A. K., Tichu M. K. (1999) An update on GABA_A receptors. *Brain research* 29(2-3): 196-217.
- Miettinen R., Gulyas A. I., Baimbrigde K. G., Jacobowitz D. M., Freund T. F. (1992) Calretinin is present in non pyramidal cells in the rat hippocampus II. Co-existence with other calcium-binding proteins and GABA. *Neuroscience* 48(1): 29-43.
- Misgeld V., Bijak M., Javolimek W. (1995) A physiological role for GABA_B receptors and the effects of baclofen in the mammalian central nervous system. *Progress in neurobiology* 46(4): 423-462.

- Montecot C., Rondi-reig L., Springhetti V., Seylaz J., Pinard E. (1998) Inhibitor of neuronal (type I) nitric oxide synthase presents hyperaemia and hippocampal lesions resulting from kainite-induced seizures, *Neuroscience* 13(2): 183-194.
- Moser M. B., Moser E. I., Forrest E. Andersen P., Morris R. G. (1995) Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92(21): 9671-9701.
- Moser M. B., Moser E. I. (1998) Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus* 8(6): 608-619.
- Moss S. J., Smart T. G. (2001) Constructing inhibitory synapses. *Nat. Rev. Neuroscience* 2(4): 240-250.
- Murphy J. M., Meeker R. B., Porada K. J., Nagy Z. M. (1979) GABA-mediated behavioral inhibition during ontogeny in the mouse. *Psychopharmacology* 64(2): 237-242.
- Nieuwenhuys R., Voogd J., Van Huijen C. (1997) *Το κεντρικό νευρικό σύστημα του ανθρώπου. Σύνοψη και άτλαντας*. Εκδόσεις Κυριακίδη.
- Nomura T., Fukuda T., Aika Y., Heizmann C. W., Emson P. C., Kosabayash T., Kosaka T. (1997) Distribution of non principal neurons in the rat hippocampus with special reference to their dorsoventral difference. *Brain Res.* 751(1): 64-80.
- Nomura T., Fukuda T., Aika Y., Heizmann C. W., Emson P. C., Kosabayash T., Kosaka T. (1997) Laminar distribution of non principal neurons in the rat hippocampus, with special reference to their compositional difference among layers. *Brain Res.* 764(1-2): 197-204.
- Ottersen O. P., Storm-Mathisen J. (1984) Glutamate and GABA-containing neurons in the mouse and rat brain, as demonstrated with a new immunocytochemical technique. *Journal of Comparative Neurology* 229(3): 374-392.
- Ozawa S., Kamiya H., Tsuzuki K. (1998) Glutamate receptors in the mammalian nervous system. *Progress in Neurobiology.* 54(5): 581-618.
- Papatheodoropoulos C., Asproдини E., Nikita I., Koutsona C., Kostopoulos G. (2002) Weaker synaptic inhibition in CA1 region of ventral compared to dorsal rat hippocampal slices. *Brain Res* 948(1-2): 117-121.
- Pentkowski N. S., Blanchard D. C., Lever C., Litvin Y., Blanchard R. J. (2006) Effects of lesions to the dorsal and ventral hippocampus on defensive behaviors in rats. *Eur. J. Neurosci.* 23(8): 2185-2196.
- Perry T. L., Hansen S., Gandham S. S. (1981) Postmortem changes of amino compounds in human and rat brain. *J Neurochem.* 36(2): 406-412.

Petralia R. S., Wang Y. X., Wenthold R. J. (1994) The NMDA receptor subunits NR2A and NR2B show histological and ultrastructural localization patterns similar to those of NR1. *The Journal of neuroscience*. 14(10): 6102-6120.

Pitkanen A., Pikkarainen N., Ylinen A. (2000) Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in the rat. A review. *Ann. N Y Acad. Sci.* 911:369-391.

Poucet B., Thimus-Blanc C., Muller R. U. (1994) Place cells in the ventral hippocampus of rats. *Neuroreport* 5(16): 2045-2048.

Racine R., Rose P. A., Burnham W. M. (1977) Afterdischarge thresholds and kindling rates in dorsal and ventral hippocampus and dentate gyrus. *Can. J. Neurol. Sci.* 4(4): 273-278.

Raymon y Cajal S. (1911) *Histologie du système nerveux de l'homme & des vertébrés*. Paris: Maloine.

Ribak C. E., Vaughn J. E., Saito K. (1978) Immunocytochemical localization of glutamic acid decarboxylase in neuronal somata following colchicine inhibition of axonal transport. *Brain Res.* 140(2): 315-332.

Risold P. Y., Swanson L. W. (1996) Structural evidence from functional domains in the rat hippocampus. *Science* 272(5267): 1484-1488.

Risold P. Y., Swanson L. W. (1997) Connections of the rat lateral septal complex. *Brain research* 24(2-3): 115-195.

Rombouts S. A., Machielsen W. C., Witter M. P., Barkhof F., Lindeboom J., Scheltens P. (1997) Visual association encoding activates the medial temporal lobe: a functional magnetic resonance imaging study. *Hippocampus* 7(6): 594-601.

Room P., Groenewegen H. J. (1986) Connections of the parahippocampal cortex in the cat. II. Subcortical afferents. *Journal of Comparative Neurology* 251(4): 451-473.

Rudy J. W., Matus-Amat P. (2005) The ventral hippocampus supports a memory representation of context and contextual fear conditioning: implications for a unitary function of the hippocampus. *Behav. Neurosci.* 119(1): 154-163.

Ruth R. E., Collier T. J., Routtenberg A. (1982) Topography between the entorhinal cortex and the dentate septotemporal axis in rats: I) Medial and intermediate entorhinal projecting cell. *Journal of Comparative Neurology* 209(1): 69-78.

Schmidt-Kastner R., Freund T.F. (1991). Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience* 40(3): 599-636.

Schousboe A. (2000) Pharmacological and functional characterization of astrocytic GABA transport: a short review. *Neurochem. Res.* 25(9-10): 1241-1244.

- Schousboe A., Waagepetersen H. S., Bak L. K. (2006) The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J. Neurochem.* 98(3): 641-653.
- Seabrook G. R., Howson W., Lacey M. G. (1990) Electrophysiological characterization of potent agonists and antagonists at pre- and post-synaptic GABA_B receptors on neurons in rat brain slices. *Br. J. Pharmacol.* 101(4):949-957.
- Shepherd G. M. and Koch C. (1998) *Introduction to synaptic circuits. The synaptic Organization of the Brain.* New York: Oxford University Press.
- Sieghart W. (1995) Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acid A receptor subtypes. *Pharmacol. Rev.* 47(2): 181-234.
- Simmons M. M., Blamire I. W., Austin A. R. (1996) Simple method for the perfusion-fixation of adult bovine brain. *Res Vet Sci.* 60(3): 247-50.
- Sinnamon H. M., Freniere S., Kootz J. (1978) Rat hippocampus and memory for places of changing significance. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 92(1): 142-155.
- Siesjö B.K. (1978). *Brain energy metabolism.* John Wiley, New York.
- Small S.A. (2002) The longitudinal axis of the hippocampal formation: its anatomy, circuitry and role in cognitive function. *Rev. Neurosci.* 13(2): 183-194.
- Sloviter R. S., Nilaver G. (1987) Immunocytochemical localization of GABA-, cholecystokinin-, vasoactive intestinal polypeptide- and somatostatin-like immunoreactivity in the area dentate and hippocampus of the rat. *J. Comp. Neurol.* 256(1): 42-60.
- Somogyi P., Fritschy J. M., Benke D., Roberts J. P., Sieghart W. (1996) The gamma 2 subunit of the GABA_A receptor is concentrated in synaptic junctions containing the alpha 1 and beta 2/3 subunits in hippocampus, cerebellum and globus pallidus. *Neuropharmacology.* 35(9-10): 1425-1444.
- Somogyi P., Hodgson A. J., Smith A. P., Nunzi M. G., Gorio A., Wu J. Y. (1984) Different populations of GABAergic neurons in the visual cortex and hippocampus of cat containing somatostatin- or cholecystokinin immunoreactive material. *J. Neuroscience* 4(1):2590-2603.
- Somogyi P., Smith A. P., Nunzi M. G., Govio A., Takagi H., Wu J-Y. (1983) Glutamate decarboxylase immunoreactivity in the hippocampus of the cat: distribution of immunoreactive synaptic terminals with special reference to the axon initial segment of pyramidal neurons *J. Neuroscience* 3(7): 1450-1468.
- Somogyi P. and Klausberger T. (2005) Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *J. Physiol.* 562(1): 9-26.

- Sotiriou E., Papatheodoropoulos C., Angelatou F. (2005) Differential expression of gamma-aminobutyric acid-a receptor subunits in rat dorsal and ventral hippocampus. *J. Neuroscience* 25(5): 690-700.
- Stern C. E., Corkin S., Gonzalez R. G., Guimaraes A. R., Baker J. R., Jennings P. J., Carr C. A., Sugiura R. M., Vedantham V., Rosen B. R. (1996) The hippocampal formation participates in novel picture encoding: evidence from functional magnetic resonance imaging. *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93(16): 8660-8665.
- Sullivan E. V., Marsh L., Mathalon D. H., Lim K. O., Pfefferbaum A. (1995) Anterior hippocampal volume deficits in nonamnesic, aging chronic alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 19(1): 110-122.
- Svoboda R. K., Adams E. C., Lupica R. C. (1999) Opioid receptor subtype expression defines morphologically distinct classes of hippocampal interneurons. *The Journal of Neuroscience* 19(1):85-95.
- Thavarajah R., Mudimbaimannar V. K, Elizabeth J., Rao U. K, Ranganathan K. (2012) Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. *J Oral Maxillofac Pathol.* 16(3): 400–405.
- Van Leeuwen F. W., Van Heerikhuize J., Van der Meulen G., Wolters P. (1985) Light microscopic autoradiographic localization of [3H]oxytocin binding sites in the rat brain, pituitary and mammary gland. *Brain Res.* 359(1-2): 320-325.
- Wedzony K., Czyrak A. (1997) The distribution of the NMDA R1 subunit in the rat hippocampus – an immunocytochemical study. *Brain Research.* 768: 333–337.
- Witter M. P., Van Hoersen G. W., Amaral D. G. (1989b) Topographical organization of the entorhinal projection to the dentate gyrus of the monkey. *Journal of Neuroscience* 9(1): 211-218.
- Witter M. P., Amaral D. G. (1991) Entorhinal cortex of the monkey: V. Projections to the dentate gyrus, hippocampus and subicular complex. *J. Comp. Neurol.* 307(3): 437-459.
- Woodson W., Nitecka L., Ben-Ari Y. (1989) Organization of the GABAergic system in the rat hippocampal formation: a quantitative immunocytochemical study. *Journal of Comparative Neurology.* 280(2):254-271.
- Yamatsu K., Yamanishi Y., Ikeda M., Uzno T., Okada Y. (1982) Postmortem GABA increase in discrete regions of the brain. In: Okada Y., Roberts E. (Eds) *Problems in GABA research from brain to bacteria*. Experta Medica, Amsterdam.
- Zola-Morgan S., Squire L. R., Amaral D. G. (1986) Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J. Neurosci.* 6(10): 2950-2967.